



Universidade de Aveiro  
Ano 2018

Departamento de Química

**Alexandra Sofia Braga de Jesus**

**ESTRATÉGIAS PARA O INCREMENTO DA  
SOLUBILIDADE DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS E  
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA  
O SEU DOSEAMENTO**



Universidade de Aveiro  
Ano 2018

Departamento de Química

**Alexandra Sofia Braga de Jesus**

**ESTRATÉGIAS PARA O INCREMENTO DA  
SOLUBILIDADE DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS E  
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA  
O SEU DOSEAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira, Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Ana Sofia Tremoceiro Lourenço, Cientista Sénior da Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

**o júri**  
presidente

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva  
Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Tereza Seabra dos Reis Gomes  
Professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Sofia Tremoceiro Lourenço  
Cientista Sénior da Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

## **agradecimentos**

Agradeço à orientadora da Bluepharma Ana Sofia Lourenço, ao António Nunes e à Tânia Santos por todos os ensinamentos, pela paciência e, sobretudo pela oportunidade de crescimento académico e pessoal.

Agradeço ao orientador da Universidade de Aveiro Doutor João Oliveira, pela disponibilidade prestada ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço à Doutora Cláudia Silva pela oportunidade de realização do estágio curricular na empresa Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

Ao grupo de Investigação da Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. pelo carinho com que me acolheram, pelo apoio e auxílio durante a realização do estágio.

Aos restantes colegas da Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. que me acolheram da melhor forma e conviveram comigo diariamente durante a realização desta tese.

Aos meus pais, irmão e restante família, um agradecimento enorme por tudo o que fizeram por mim, pelo apoio incansável, carinho, força e incentivo permanentes, imprescindíveis e fundamentais na motivação, para a realização e conclusão deste trabalho.

Ao Pedro, um agradecimento especial e sentido, pelo amor, amizade e apoio incondicionais que sempre me incentivaram a fazer mais e a ir mais longe.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e me deram um motivo para sorrir.

A todos os meus mais sinceros agradecimentos.

## **palavras-chave**

Solubilidade; Co-solventes; Ciclodextrinas; Surfactantes; Métodos Analíticos; Validação; Quantificação; Substâncias Ativas;

## **resumo**

A grande maioria das novas moléculas farmacêuticas apresenta uma baixa solubilidade em água e conseqüentemente uma fraca absorção após administração oral. Um dos desafios da indústria farmacêutica consiste em desenvolver formulações inovadoras que permitam melhorar a solubilidade das moléculas, bem como, a sua biodisponibilidade.

No presente trabalho foram exploradas diferentes estratégias para aumentar a solubilidade de várias substâncias ativas (SA), pertencentes a diferentes classes biofarmacêuticas, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS). As estratégias passaram pelo uso de co-solventes (Etanol absoluto e Polietilenoglicol 400), ciclodextrinas (Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina) e/ou surfactantes (Lauril sulfato de sódio, Tween 80, Kolliphor P407 Micro e Polietilenoglicol 6000).

Para avaliar a eficácia das diferentes estratégias implementadas, foram desenvolvidos métodos analíticos para espectroscopia ultravioleta-visível, permitindo o correto doseamento das diferentes moléculas em estudo.

Os métodos analíticos foram validados de acordo com as diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização (ICH), tendo sido avaliados parâmetros como a especificidade, precisão, linearidade e exatidão.

O aumento da solubilidade foi conseguido para a SA de classe BCS II com recurso a ciclodextrinas; para a SA de classe BCS III pelo uso de surfactantes; e a SA de classe BCS IV com a combinação de co-solventes e surfactantes. Para a SA de classe BCS I como expectável não foi necessário aplicar nenhuma estratégia para aumentar a sua solubilidade.

**keywords**

Solubility; Co-solvents; Cyclodextrins; Surfactants; Analytical Methods; Validation; Quantification; Drug Substance;

**abstract**

The vast majority of the new pharmaceutical molecules have low solubility in water, and consequently poor absorption after oral administration. One of the challenges of the pharmaceutical industry is to develop innovative formulations that improve the solubility of molecules as well as their bioavailability.

In the current work, different strategies were explored in order to increase the solubility of different drug substances (DS). The strategies involved the use of co-solvents (Absolute ethanol and Polyethylene glycol 400), cyclodextrins (Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) and/or surfactants (Sodium lauryl sulfate, Tween 80, Kolliphor P407 Micro and Polyethylene glycol 6000). Determining the solubility in a rigorous and reliable way was possible due to the development of analytical methods for each drug substances. Thus, the current work depicts the development of analytical methods by ultraviolet–visible spectroscopy for the quantification of different drug substances that belong to different biopharmaceutical classes, according to the Biopharmaceutical Classification System (BCS). The analytical methods were validated according to the guidelines of the International Conference of Harmonization (ICH), where parameters like specificity, precision, linearity and accuracy were evaluated. The increase of the solubility was achieved for DS class BCS II using cyclodextrins; for DS class BCS III with the use of surfactants; and for DS class BCS IV with the combination of co-solvents and surfactants. For DS class BCS I it was not necessary to apply any strategy to increase its solubility.

## Lista de Abreviaturas

<b>Abs</b>	Absorvância
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>BCS</b>	Sistema de Classificação Biofarmacêutica, do inglês <i>Biopharmaceutics Classification System</i>
<b>CA</b>	Critério de aceitação
<b>CD</b>	Ciclodextrina
<b>CGTase</b>	Ciclodextrina Glucanotransferase
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	Metanol
<b>CMC</b>	Concentração Micelar Crítica
<b>DMF</b>	do inglês <i>Drug Master File</i>
<b>DS</b>	do inglês <i>Drug Substances</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>EU</b>	Farmacopeia Europeia, do inglês <i>European Pharmacopoeia</i>
<b>FDA</b>	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier do inglês <i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
<b>GC</b>	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
<b>GMP</b>	Boas Práticas de Fabrico, do inglês <i>Good Manufacturing Practices</i>
<b>H<sub>2</sub>O u.p.</b>	Água ultrapura
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HP</b>	Hidroxipropil
<b>ICH</b>	Conferência Internacional de Harmonização, do inglês <i>International Conference on Harmonisation</i>
<b>IC 95 %</b>	Intervalo de Confiança a 95 %
<b>MRf</b>	Média dos Fatores de Resposta
<b>OH</b>	Hidroxilo
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PDA</b>	Arranjo de Fotodíodo, do inglês <i>Photodiode Array</i>

<b>Rf</b>	Fator de Resposta, do inglês <i>Response Factor</i>
<b>RF</b>	Fórmula Reconstituída, do inglês <i>Reconstituted Formula</i>
<b>rpm</b>	Rotações Por Minuto
<b>RSD</b>	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
<b>SA</b>	Substância Ativa
<b>SD</b>	Desvio Padrão, do inglês <i>Standard Deviation</i>
<b>SLS</b>	Lauril Sulfato de Sódio, do inglês <i>Sodium Lauryl Sulfate</i>
<b>SBE</b>	Sulfobutiléter
<b>USP</b>	Farmacopeia dos Estados Unidos, do inglês <i>United States Pharmacopeia</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visível



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS).	6
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo da estrutura de um surfactante com um grupo polar (cabeça) e apolar (cauda).	10
<b>Figura 3.</b> Estrutura de uma micela, os grupos polares apresentam-se à superfície e os grupos apolares encontram-se no interior hidrofóbico.	11
<b>Figura 4.</b> Representação logarítmica da tensão superficial versus a concentração de surfactante e a relação com a CMC.	12
<b>Figura 5.</b> Estrutura de diferentes tipos de surfactantes: i. surfactante não iónico (alquilo glicosídeo), ii. surfactante aniónico (lauril éter sulfato), iii. surfactante catiónico (sal de amina) e iv. surfactante zwitteriónico (betaína).	13
<b>Figura 6.</b> Estrutura química das ciclodextrinas naturais: $\alpha$ -CD, $\beta$ -CD e $\gamma$ -CD.	15
<b>Figura 7.</b> Representação da estrutura em cone truncado da $\beta$ -CD.	15
<b>Figura 8.</b> Formação de um complexo de inclusão entre uma ciclodextrina e uma molécula hidrofóbica em solução aquosa.	17
<b>Figura 9.</b> Etapas envolvidas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos: investigação e desenvolvimento, ensaios clínicos, aprovação e pós-aprovação.	20
<b>Figura 10.</b> Esquematização dos componentes de um espectrofotómetro de duplo feixe.	21
<b>Figura 11.</b> Espectro da solução de SA classe BCS II a 0,02 mg/mL.	34
<b>Figura 12.</b> Espectro da solução de SA classe BCS IV a 0,03 mg/mL.	34
<b>Figura 13.</b> Espectro da solução de SA classe BCS I a 0,08 mg/mL.	34
<b>Figura 14.</b> Espectro da solução de SA classe BCS III a 0,02 mg/mL.	34
<b>Figura 15.</b> Espectro da solução de SA classe BCS I a 0,04 mg/mL.	35
<b>Figura 16.</b> Espectro da solução de SA classe BCS III a 0,04 mg/mL.	35
<b>Figura 17.</b> Sobreposição de espectros de soluções de excipientes, SA classe BCS I e RF.	36
<b>Figura 18.</b> Sobreposição de espectros de soluções de excipientes, SA classe BCS II e RF.	36
<b>Figura 19.</b> Sobreposição de espectros de soluções de excipientes, SA classe BCS III e RF.	37
<b>Figura 20.</b> Sobreposição de espectros de soluções de excipientes, SA classe BCS IV e RF.	37
<b>Figura 21.</b> Curva de calibração da SA de classe BCS I.	41
<b>Figura 22.</b> Curva de calibração da SA de classe BCS II.	41
<b>Figura 23.</b> Curva de calibração da SA de classe BCS III.	42
<b>Figura 24.</b> Curva de calibração da SA de classe BCS IV.	42
<b>Figura 25.</b> Diagrama esquemático do protocolo de solubilidade.	48
<b>Figura 26.</b> Perfil de solubilidade da SA de classe BCS II.	53
<b>Figura 27.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução aquosa.	57
<b>Figura 28.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução hidroalcoólica.	59
<b>Figura 29.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução aquosa.	63
<b>Figura 30.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica.	65

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classificação da solubilidade em termos de partes de solvente usadas para uma parte de soluto e o respectivo intervalo de concentrações, expresso em mg/mL.....	7
<b>Tabela 2.</b> Comparação da solubilidade aquosa entre ciclodextrinas naturais e derivados de ciclodextrinas. ....	16
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros de validação a analisar para ensaios de identificação, impurezas e conteúdo. ....	25
<b>Tabela 4.</b> Critérios de aceitação dos parâmetros de validação: especificidade, precisão de sistema, linearidade e exatidão para métodos analíticos UV-Vis desenvolvidos para a quantificação de uma substância ativa no produto medicamentoso. ....	31
<b>Tabela 5.</b> Resultados do parâmetro especificidade, interferências I e 2, para as substâncias ativas de classes BCS I, II, III e IV no comprimento de onda definido no método analítico de cada SA e avaliação do critério de aceitação para as interferências. ....	39
<b>Tabela 6.</b> Resultados da precisão do sistema para as diferentes substâncias ativas, obtidas através de seis leituras da solução de SA na concentração de trabalho do método e avaliação do critério de aceitação para o RSD obtido.....	39
<b>Tabela 7.</b> Resultados da média das absorvâncias das soluções a diferentes níveis de concentração da SA de classe BCS I.....	40
<b>Tabela 8.</b> Resultados da média das absorvâncias das soluções a diferentes níveis de concentração da SA classe de BCS II.....	40
<b>Tabela 9.</b> Resultados da média das absorvâncias das soluções a diferentes níveis de concentração da SA de classe BCS III.....	41
<b>Tabela 10.</b> Resultados da média das absorvâncias das soluções a diferentes níveis de concentração da SA de classe BCS IV.....	41
<b>Tabela 11.</b> Resultados dos parâmetros da regressão linear: declive, ordenada na origem, soma dos resíduos quadrados, coeficiente de correlação, percentagem da ordenada na origem das SAs de classe BCS I, II, III e IV e avaliação de acordo com os critérios de aceitação dos parâmetros do coeficiente de correlação e percentagem da ordenada na origem. ....	43
<b>Tabela 12.</b> Resultado do parâmetro exatidão para as amostras de SA de classe BCS I, II, III e IV, a partir dos valores de concentração teórica e concentração obtidos para determinar a recuperação das amostras, recuperação média, SD, RSD e intervalo de confiança a 95 % e avaliação de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para a recuperação e RSD. ....	44
<b>Tabela 13.</b> Condições dos métodos analíticos: solvente, concentração de trabalho, deteção, células, temperatura e equipamento usados para as substâncias ativas de classe BCS I, II, III e IV. ....	46
<b>Tabela 14.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS I em solução aquosa. ....	50
<b>Tabela 15.</b> Resultados da solubilidade em solução aquosa da SA de classe BCS II.....	51
<b>Tabela 16.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS II em solução hidroalcoólica.....	51
<b>Tabela 17.</b> Resultado do estudo de solubilidade de fase para a SA de classe BCS II em solução aquosa com diferentes percentagens de ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD). ....	52
<b>Tabela 18.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução aquosa.....	54
<b>Tabela 19.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução aquosa com diferentes surfactantes.....	55

<b>Tabela 20.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução hidroalcoólica e solução aquosa com co-solvente (PEG 400). .....	56
<b>Tabela 21.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução hidroalcoólica com surfactantes e o co-solvente PEG 400. ....	58
<b>Tabela 22.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução aquosa. ....	60
<b>Tabela 23.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução aquosa com diferentes surfactantes.....	61
<b>Tabela 24.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica e solução aquosa com co-solvente (PEG 400). ....	62
<b>Tabela 25.</b> Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica com surfactantes e o co-solvente PEG 400. ....	64
<b>Tabela 26.</b> Quadro resumo com a solubilidade obtida em solução aquosa, a(s) estratégia(s) usada(s) para obter a solubilidade máxima para as diferentes substâncias ativas e o intervalo da solubilidade alvo.....	66

## Conteúdo

<b>Agradecimentos</b> .....	ii
<b>Resumo</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	iv
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	v
<b>Lista de Figuras</b> .....	vii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	viii
1. Introdução .....	1
1.1. Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. ....	1
2. Contextualização.....	2
2.1. Formas Farmacêuticas .....	2
2.1.1. Formas Farmacêuticas Orais Líquidas Não Estéreis .....	4
2.2. Sistema de Classificação Biofarmacêutica .....	5
2.3. Desafios de Substâncias Ativas Pouco Solúveis em Água .....	6
2.4. Solubilidade.....	7
2.5. Estratégias para Aumentar a Solubilidade de Substâncias Ativas.....	8
2.5.1. Co-solventes .....	9
2.5.2. Surfactantes .....	9
2.5.2.1. Estrutura e Propriedades .....	9
2.5.2.2. Formação de Micelas.....	11
2.5.2.3. Tipos de Surfactantes .....	13
2.5.2.4. Aplicações dos Surfactantes .....	14
2.5.3. Ciclodextrinas .....	14
2.5.3.1. Estrutura e Propriedades .....	14
2.5.3.2. Derivados .....	16
2.5.3.3. Ciclodextrinas Aprovadas pela FDA.....	17
2.5.3.4. Complexos de Inclusão .....	17
2.5.3.4.1. Métodos de produção de complexos de inclusão.....	18
2.5.3.4.2. Métodos para melhorar a complexação .....	18
2.5.3.5. Agregação de Ciclodextrinas .....	18
2.5.3.6. Aplicações das Ciclodextrinas.....	19
2.5.4. Outras Estratégias .....	19
2.6. Desenvolvimento de Métodos Analíticos na Indústria Farmacêutica .....	20
2.7. Validação de Métodos Analíticos .....	23

3.	Objetivos.....	26
4.	Desenvolvimento e Validação de Métodos por Espectroscopia UV-Vis.....	27
4.1.	Experimental.....	27
4.1.1.	Materiais .....	27
4.1.2.	Equipamentos .....	27
4.1.3.	Desenvolvimento de Métodos Analíticos .....	28
4.1.4.	Parâmetros de Validação de Métodos Analíticos .....	29
4.1.4.1.	Especificidade.....	29
4.1.4.2.	Precisão do Sistema.....	29
4.1.4.3.	Linearidade .....	30
4.1.4.4.	Exatidão .....	30
4.1.4.5.	Gama .....	31
4.1.5.	Critérios de Aceitação de Parâmetros de Validação de Métodos Analíticos.....	31
4.2.	Resultados e Discussão .....	32
4.2.1.	Desenvolvimento de Métodos Analíticos por Espectroscopia UV-Vis .....	32
4.2.1.1.	Escolha do solvente.....	32
4.2.1.2.	Escolha da concentração de trabalho .....	33
4.2.1.3.	Seleção do comprimento de onda .....	35
4.2.2.	Parâmetros de Validação de Métodos Analíticos .....	36
4.2.2.1.	Especificidade.....	36
4.2.2.2.	Precisão do Sistema.....	39
4.2.2.3.	Linearidade .....	40
4.2.2.4.	Exatidão .....	44
4.3.	Condições dos Métodos para as Substâncias Ativas de Classe BCS I, II, III e IV .....	46
5.	Estratégias para o Incremento da Solubilidade de Substâncias Ativas.....	47
5.1.	Experimental.....	47
5.1.1.	Materiais .....	47
5.1.2.	Equipamentos .....	47
5.1.3.	Protocolo de Solubilidade .....	48
5.2.	Resultados e Discussão .....	49
5.2.1.	Substância Ativa Classe BCS I .....	49
5.2.2.	Substância Ativa Classe BCS II .....	50
5.2.3.	Substância Ativa Classe BCS III .....	54
5.2.4.	Substância Ativa Classe BCS IV.....	60

6. Conclusões.....	67
<b>Bibliografia.....</b>	<b>69</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>74</b>

## I. Introdução

### I.1. Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

A Bluepharma é uma empresa de Indústria Farmacêutica, com sede em São Martinho do Bispo, Coimbra. Em 2001 iniciou a sua atividade após ter adquirido a unidade industrial pertencente à multinacional alemã Bayer.

A Bluepharma centra os seus esforços no fabrico, investigação, desenvolvimento e comercialização de medicamentos, percorrendo toda a cadeia de valor do medicamento, comprometendo-se pela excelência na qualidade dos seus produtos, em paralelo com o respeito e proteção ao nível da segurança interna dos seus colaboradores e do meio ambiente.

Atualmente, a Bluepharma é uma das empresas mais empreendedoras e inovadoras no sector farmacêutico, destacando-se tanto a nível do mercado nacional como no mercado internacional, contado já com delegações abertas em Espanha, Angola, Moçambique, Colômbia, Chile, Brasil e Estados Unidos da América (EUA), e tendo exportado, em 2017, 85 % da sua produção para mais de 40 países. A exigência dos mercados abrangidos pela Bluepharma conduziu à implementação de um sistema integrado de Qualidade, Ambiente, Higiene e Segurança apoiado pelas normas ISO 9001, ISO 18001 e OHSAS 18001, assim como as Boas Práticas de Fabrico (GMP) e outra legislação em vigor, incluindo a requisição de auditorias internas e/ou auditorias solicitadas pelos clientes com o intuito de comprovar a conformidade e credibilidade de todos os processos realizados na empresa.

A Bluepharma engloba um departamento de Investigação e Desenvolvimento com investigação em áreas tão emergentes como a nanotecnologia, oncologia e biotecnologia, com o objetivo de desenvolver novos medicamentos genéricos. Neste departamento também são realizadas atividades de desenvolvimento de formulações farmacêuticas, métodos analíticos e processos de fabrico, assim como estudos de estabilidade e transposição de escala.

A Bluepharma reserva-se ao direito de proteção dos produtos em questão pelo que, na presente dissertação, são omissas todas e quaisquer designações, que a empresa julgue

necessárias, eliminando deste modo qualquer tentativa de cópia indevida ou perda de sigilo de propriedade industrial.

## 2. Contextualização

### 2.1. Formas Farmacêuticas

Medicamento, também designado por Produto Medicamentoso, é definido pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde do seguinte modo: *“Substância ou composição de substâncias que possuam propriedades curativas ou preventivas das doenças e dos seus sintomas, do homem ou do animal, com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou a restaurar, corrigir ou modificar as suas funções”* [1].

Os produtos medicamentosos são apresentados ao público numa determinada forma farmacêutica que é alcançada após um longo processo de investigação que termina com a sua produção [2].

Forma farmacêutica é definida como o *“Estado final que as substâncias ativas ou excipientes apresentam depois de submetidas às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e obter o maior efeito terapêutico desejado”* [3,4].

Substância ativa (SA) é *“qualquer substância ou mistura de substâncias destinada a ser utilizada no fabrico de um medicamento e que, quando utilizada no seu fabrico, se torna um princípio ativo desse medicamento, destinado a exercer uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica com vista a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas ou a estabelecer um diagnóstico médico”* [3].

Excipiente é *“qualquer matéria-prima que, incluída nas formas farmacêuticas, se junte às substâncias ativas ou suas associações para servir-lhes de veículo, possibilitar a sua preparação ou estabilidade, modificar as suas propriedades organoléticas ou determinar as propriedades físico-químicas do medicamento e a sua biodisponibilidade”* [3].

As formas farmacêuticas são classificadas de acordo com a via de administração, em oral, tópica, parenteral, inalatória, oftálmica, rectal e vaginal, e com base na forma física em sólidos, semi-sólidos, líquidos e gasosos.

A escolha da forma farmacêutica depende de vários fatores, entre os quais a natureza físico-química do medicamento, o mecanismo e local de ação do medicamento, e a



dosagem, isto é, a quantidade de substância ativa no medicamento. Este processo tem como objetivo facilitar a administração e ingestão da substância ativa, proteger a substância durante o percurso pelo organismo e garantir a presença da substância no local de ação específico e alcançar uma resposta segura e terapeuticamente eficaz [2]. A eficácia da resposta terapêutica é alcançada quando, após a administração da forma farmacêutica, uma quantidade suficiente do fármaco é absorvida no local de ação, e subsequentemente, ocorrem os processos de distribuição, metabolismo e excreção. A quantidade disponibilizada para ser absorvida constitui um fator crucial, na medida em que concentrações elevadas podem comprometer a segurança dos indivíduos, a ponto de causar efeitos tóxicos, e por outro lado, concentrações baixas não conduzem à ação farmacológica desejada [2].

A biodisponibilidade é o termo que define a quantidade de substância ativa que atinge a circulação sanguínea no local de ação e, conseqüentemente, produz uma resposta farmacológica. Nem todos os medicamentos são concebidos para serem absorvidos na corrente sanguínea, e por isso, nesses casos a biodisponibilidade é avaliada tendo em conta a extensão de absorção da substância ativa disponível no local de ação [2].

No desenvolvimento de uma forma farmacêutica para um medicamento genérico, a biodisponibilidade é um parâmetro crítico, visto que a nova composição, nomeadamente os excipientes, podem afetar negativamente a biodisponibilidade [2].

Durante o desenvolvimento de uma forma farmacêutica a garantia da qualidade é assegurada através de práticas GMP, testes de controlo de qualidade da matéria-prima e produto final de acordo com as especificações da Conferência Internacional de Harmonização (ICH), os quais são validados para demonstrar que são adequados ao seu propósito. Para além de que é importante estudar a estabilidade da forma farmacêutica ao longo do tempo para verificar que esta não afeta a substância ativa ou os excipientes que a constituem [2]. No geral, os estudos de formulação realizados consideram fatores como a solubilidade, tamanho de partícula, polimorfismo e pH, a fim de verificar se estes influenciam a biodisponibilidade e, conseqüentemente, a atividade da substância ativa [4].

### 2.1.1. Formas Farmacêuticas Orais Líquidas Não Estéreis

A via de administração mais conveniente para a maioria dos pacientes é a via oral, também designada por enteral [2]. Nos EUA e na Europa cerca de 85 % dos medicamentos mais vendidos correspondem a medicamentos administrados por via oral [5].

As formas farmacêuticas orais líquidas são utilizadas comumente para facilitar a administração de medicamentos em pacientes de diferentes faixas etárias, como idosos e crianças, ou indivíduos com condições especiais, no caso de apresentarem dificuldade em ingerir formas sólidas, ainda com a vantagem de possibilitar a entrega de doses elevadas sem causar desconforto na administração ao paciente [6]. Formas farmacêuticas orais líquidas são soluções orais (Bisolvon®), emulsões (Aero-OM®), suspensões (ib-u-ron®), elixires (Listerine®), xaropes (Levotuss®) ou gotas (Dulcogotas®). Os exemplos referem-se a medicamentos apresentados ao público sob determinada forma farmacêutica oral líquida.

As formas farmacêuticas orais líquidas são preparações formadas pela dispersão de uma ou mais substâncias ativas num solvente adequado, ou numa mistura de solventes miscíveis entre si, obtidas a partir da dissolução da substância ativa num solvente aquoso ou não aquoso, com posterior suspensão ou incorporação da substância ativa na formulação [2].

As formas farmacêuticas orais líquidas classificam-se em não estéreis, dado que nestas é admitida a presença de carga microbiana até um determinado limite, dependente do seu modo de utilização, com a salvaguarda de que não é comprometida a qualidade do produto e a segurança do consumidor. Repetidamente, a segurança do consumidor é conseguida através da avaliação da estabilidade do produto, isto é, se ocorre perda da atividade terapêutica, e/ou mudanças das características do produto (pH, solubilidade, precipitação, alteração da viscosidade) [2].

No desenvolvimento de novos produtos medicamentosos, o grau de aceitação com o paciente, a redução de custos e a flexibilidade da forma farmacêutica influenciam a produção de formas farmacêuticas orais nas empresas de medicamentos genéricos [7]. Estas formas farmacêuticas implicam a incorporação da substância ativa num solvente e conduzem à realização de estudos com o intuito de detetar qual a incorporação da

substância ativa na formulação, uma vez que a maioria dos princípios ativos é menos solúvel em soluções aquosas do que em formas farmacêuticas sólidas [8].

## 2.2. Sistema de Classificação Biofarmacêutica

A importância da solubilidade nos processos de pré-formulação na indústria farmacêutica permitiu a criação de um sistema de classificação de moléculas [9].

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) é um modelo fornecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) que prevê os parâmetros de solubilidade e permeabilidade intestinal [9,10].

Este foi desenvolvido com base na administração por via oral tendo em conta a solubilidade e permeabilidade da dosagem mais alta de um produto medicamentoso [5,7]. De acordo com o sistema BCS, um fármaco é considerado muito solúvel quando a sua maior dosagem é solúvel em pelo menos 250 mL de solução aquosa com um pH entre 1 e 7,5 [11]. Por outro lado, um fármaco é considerado altamente permeável quando a sua absorção é igual ou superior a 90 %, quando comparada com a mesma substância administrada por injeção intravenosa [11].

Este sistema divide as substâncias em quatro classes como representado na Figura 1. As substâncias ativas pertencentes à classe BCS I apresentam elevada solubilidade e permeabilidade, as pertencentes à classe BCS II possuem baixa solubilidade e elevada permeabilidade, as substâncias ativas pertencentes à classe BCS III apresentam elevada solubilidade e baixa permeabilidade, e por último as substâncias ativas de classe BCS IV classificam-se como tendo baixa solubilidade e permeabilidade [5].



**Figura 1.** Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS).

Adaptado de [5].

Este sistema de classificação é uma ferramenta importante no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, dado que permite planejar quais as substâncias com maior propensão para determinada forma farmacêutica [5].

### 2.3. Desafios de Substâncias Ativas Pouco Solúveis em Água

De acordo com a *Particle Sciences* no desenvolvimento de novos produtos a percentagem de substâncias ativas pertencentes à classe BCS II aumentou de 30 % para 60 %, e em contrapartida as pertencentes à classe BCS I diminuíram de 40 % para 20 % no mesmo intervalo de tempo [5].

Segundo a literatura, 70 % dos compostos utilizados no desenvolvimento de novos medicamentos foram considerados praticamente insolúveis em água [8,12] e a tendência aponta para o aumento de moléculas com baixa solubilidade aquosa [8].

No processo de desenvolvimento de formas farmacêuticas orais a biodisponibilidade é um fator essencial que depende fundamentalmente da solubilidade e da permeabilidade das substâncias ativas [7,13]. A solubilidade desempenha um papel importante, uma vez que permite a libertação da substância ativa na circulação sanguínea, de forma a alcançar uma resposta farmacológica eficiente. Quando as substâncias ativas apresentam baixa solubilidade em solução aquosa, não têm a capacidade de ser absorvidas no local de ação, comprometendo a biodisponibilidade dos fármacos [14].

Em resposta ao aumento de substâncias ativas pouco solúveis em solução aquosa um dos fatores mais desafiantes no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas assenta na melhoria da solubilidade das substâncias ativas [8,12] e, consequentemente, no aumento da sua biodisponibilidade.

#### 2.4. Solubilidade

A solubilidade é definida como “a propriedade de uma substância química sólida, líquida ou gasosa, designada de soluto se dissolver num solvente, geralmente líquido, e formar uma solução homogênea em equilíbrio dinâmico” [14].

O grau de solubilidade de uma substância num solvente é medido como a concentração de saturação em que o aumento da quantidade de soluto não aumenta a concentração da solução. A solubilidade pode ser expressa em unidades de concentração, molalidade, fração molar ou razão molar [13].

A Farmacopeia dos Estados Unidos (USP) classificou a solubilidade em termos de quantidade de solvente necessário para solubilizar uma quantidade de soluto. Os critérios estão descritos na Tabela I.

**Tabela I.** Classificação da solubilidade em termos de partes de solvente usadas para uma parte de soluto e o respetivo intervalo de concentrações, expresso em mg/mL.

<b>Termo</b>	<b>Partes de solvente usadas para uma parte de soluto</b>	<b>Intervalo de Concentrações (mg/mL)</b>
Muito Solúvel	< 1	≥ 1000
Facilmente Solúvel	De 1 a 10	De 100 a 1000
Solúvel	De 10 a 30	De 33 a 100
Ligeiramente Solúvel	De 30 a 100	De 10 a 33
Pouco Solúvel	De 100 a 1000	De 1 a 10
Muito Pouco Solúvel	De 1000 a 10000	De 0,1 a 1
Praticamente Insolúvel	≥ 10000	< 0,1

Adaptado de [15].

A determinação da solubilidade de substâncias ativas em solução aquosa é uma metodologia muito importante para dar suporte à pré-formulação de novas formas

farmacêuticas [16], desta maneira existem várias técnicas disponíveis para a sua determinação [13].

A técnica mais usada para a determinação da solubilidade foi desenvolvida por *Higuchi* e *Connors* [13,17] e consiste na adição de quantidades em excesso de substância ativa a uma solução de solvente até que se atinja a saturação da mesma. A solução é colocada em agitação à temperatura ambiente ou, em alguns casos, à temperatura de 37°C durante um período de pelo menos 24 horas ou até à saturação da solução e/ou através da observação de partículas não dissolvidas. As soluções são centrifugadas e/ou filtradas e o sobrenadante é retirado para análise [13].

Como referido anteriormente, no desenvolvimento precoce de novas formulações é necessário determinar a solubilidade das substâncias ativas, uma vez que este método permite realizar uma investigação num curto período de tempo acerca das opções mais promissoras para a formulação em desenvolvimento [13].

É de realçar que a solubilidade aquosa é afetada por fatores como a polaridade, uma vez que moléculas polares se dissolvem em solventes polares, e o mesmo acontece para moléculas apolares em solventes apolares, desta forma diferenças de polaridade entre o solvente e o soluto afetam a solubilidade em solução. O tamanho de partícula também é um fator a ter em conta para a solubilidade das moléculas, uma vez que, quanto menores as partículas, maior a relação entre a área de superfície e o volume, ocorrendo uma maior interação do soluto com o solvente e, conseqüentemente, maior solubilidade. Outros fatores como a temperatura, pH e equilíbrios de complexação também afetam a solubilidade de moléculas em solução aquosa [18].

## 2.5. Estratégias para Aumentar a Solubilidade de Substâncias Ativas

As estratégias utilizadas para aumentar a solubilidade de moléculas dependem de aspetos relacionados com as propriedades das substâncias ativas, dos excipientes e do tipo de forma farmacêutica [7].

De acordo com a literatura existem diversas abordagens para ultrapassar o problema de substâncias ativas pouco solúveis em solução aquosa [9]. Estas estratégias incluem o uso de co-solventes, surfactantes e ciclodextrinas, entre outras [9]. Estas estratégias

podem ainda ser combinadas para aumentar a eficácia no incremento da solubilidade de substâncias ativas [18].

#### 2.5.1. Co-solventes

Os co-solventes são solventes orgânicos miscíveis em água e são amplamente usados como estratégia para aumentar a solubilidade de substâncias pouco solúveis em água [18]. Esta estratégia foi eficientemente usada para o aumento da solubilidade de várias substâncias ativas, como por exemplo o caso do *Diazepam* e *Lorazepam* [18,19].

A polaridade do co-solvente é inferior à polaridade da água, por isso, quando o co-solvente é adicionado à água, a polaridade do solvente diminui, devido à redução das ligações de hidrogénio na mistura. A diminuição da polaridade do solvente aumenta a afinidade entre a substância ativa e o solvente, uma vez que as polaridades de ambos vão ser semelhantes, e como, semelhante dissolve semelhante, a solubilidade da substância ativa aumenta [18].

Os co-solventes orgânicos mais utilizados são o etanol absoluto, propilenoglicol, PEG 400 e glicerol [18,19].

Em sistemas que utilizam co-solventes orgânicos como estratégia, a capacidade de solubilização do co-solvente é dependente da hidrofobicidade do soluto. Deste modo, o aumento da polaridade do soluto, reduz a vantagem de solubilização do co-solvente [18]. Para maximizar a solubilidade e evitar a precipitação, os co-solventes são, muitas vezes, usados em conjunto com surfactantes, ciclodextrinas, lípidos e/ou através da alteração de pH [19].

#### 2.5.2. Surfactantes

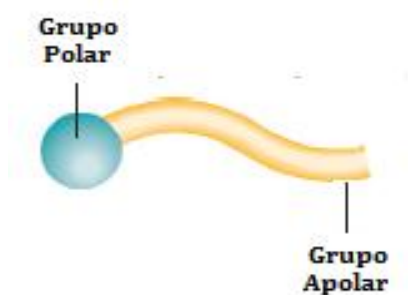
##### 2.5.2.1. Estrutura e Propriedades

Os surfactantes ou tensioativos são moléculas que reduzem a energia livre de superfícies e tensões superficiais em soluções [20].

Do mesmo modo que os solventes orgânicos em solução aquosa reduzem as interações superficiais, os surfactantes quando entram em contacto com soluções aquosas apresentam um comportamento idêntico.

Os surfactantes são moléculas anfífilas, uma vez que são constituídos pelo menos por um grupo polar e um apolar, daí a tendência de ir para interfaces com estas características. Quando um surfactante se encontra num meio em que o solvente é a água, os termos hidrofílico e hidrofóbico são comumente usados em vez da denominação polar e apolar, respetivamente [20].

Estruturalmente apresentam uma “cabeça” polar e “cauda” apolar como representado na Figura 2.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo da estrutura de um surfactante com um grupo polar (cabeça) e apolar (cauda).

Adaptado de [21].

Geralmente a “cauda” apolar é constituída por uma ou mais cadeias de carbono que podem ser lineares, ramificadas ou cíclicas, e dependendo da estrutura química dos grupos polares são atribuídas diferentes classificações aos surfactantes [21], como irá ser descrito no ponto (2.5.2.3.).

Uma das propriedades dos surfactantes é a adsorção de moléculas em interfaces, dado que esses locais reúnem as condições energeticamente mais favoráveis tendo em conta a estrutura dos surfactantes [20]. Assim, quando um surfactante entra em contacto com uma solução aquosa numa superfície hidrofóbica, normalmente orienta a sua cauda hidrofóbica em direção à superfície e expõe os grupos de cabeças polares à água. A superfície é hidrofílica e, como resultado, a tensão superficial entre a superfície e a água é



reduzida [20]. Deste modo, o aumento da concentração de surfactante desencadeia a diminuição da tensão na interface através da redução da energia livre em solução.

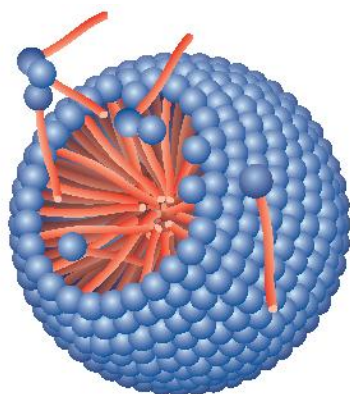
Outra propriedade destas moléculas relaciona-se com o facto de em solução aquosa os surfactantes apresentarem tendência de associação para minimizar o contacto com as moléculas de água, o que resulta na formação de agregados, designados de micelas [20].

#### 2.5.2.2. Formação de Micelas

A formação de agregados resulta da hidrofobicidade das regiões apolares em solução aquosa, desta forma as cadeias hidrofóbicas agregam-se para minimizar o contacto com a água, em oposição os grupos hidrofílicos permanecem na superfície da micela para minimizar as repulsões desfavoráveis [22].

A formação de micelas é conduzida termodinamicamente pela libertação de água envolvida na hidratação das cadeias hidrofóbicas em solução aquosa, o que leva à constrição das cadeias hidrofóbicas no núcleo da micela, enquanto os grupos hidrofílicos ficam restringidos na superfície da micela [23]. Este processo resulta na remoção de regiões hidrofóbicas da molécula de surfactante em ambiente aquoso e formação de um interior hidrofóbico, onde ocorre a incorporação de moléculas hidrofóbicas [18].

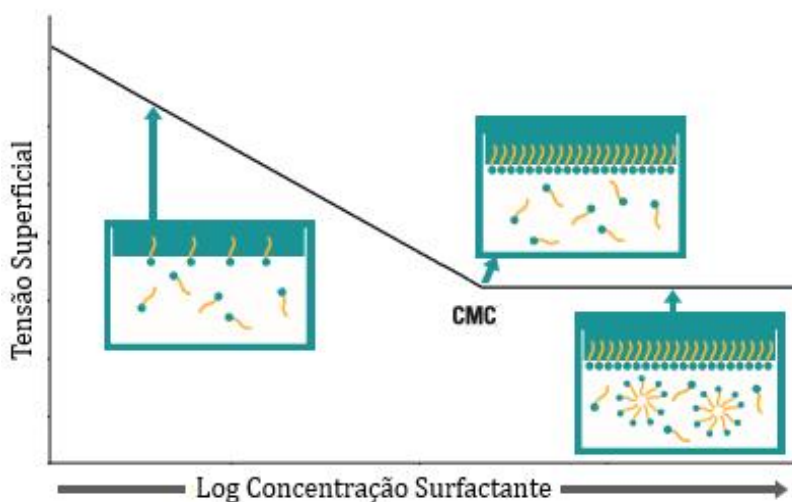
Os surfactantes tipicamente formam micelas esféricas em água, uma vez que esta conformação maximiza a área de superfície de interação com grupos polares em ambiente aquoso externo e minimiza a interação aquosa dos grupos apolares [20], como representado na Figura 3.



**Figura 3.** Estrutura de uma micela, os grupos polares apresentam-se à superfície e os grupos apolares encontram-se no interior hidrofóbico [24].

Este fenómeno é importante, uma vez que o comportamento dos surfactantes é muito diferente em micelas em comparação com surfactantes livres em solução. As micelas podem ser produzidas a uma concentração muito baixa de surfactante em água [20]. A concentração na qual as micelas se formam é chamada de concentração micelar crítica (CMC) e é uma característica de cada surfactante [18,20].

Os surfactantes alteraram a tensão superficial em resposta à variação das concentrações de surfactante. Este comportamento reflete-se numa representação logarítmica da tensão superficial versus a concentração de surfactante, na qual a intersecção corresponde à CMC [21,24], como representado na Figura 4.



**Figura 4.** Representação logarítmica da tensão superficial versus a concentração de surfactante e a relação com a CMC.

Adaptado de [21].

Para valores de concentração de surfactante abaixo da CMC, a tensão superficial diminui com o aumento da concentração de surfactante à medida que o número de surfactantes na interface aumenta. No caso de valores de concentração de surfactante acima da CMC, a tensão superficial da solução é constante, uma vez que a concentração de surfactante na interface não é alterada [21].

### 2.5.2.3. Tipos de Surfactantes

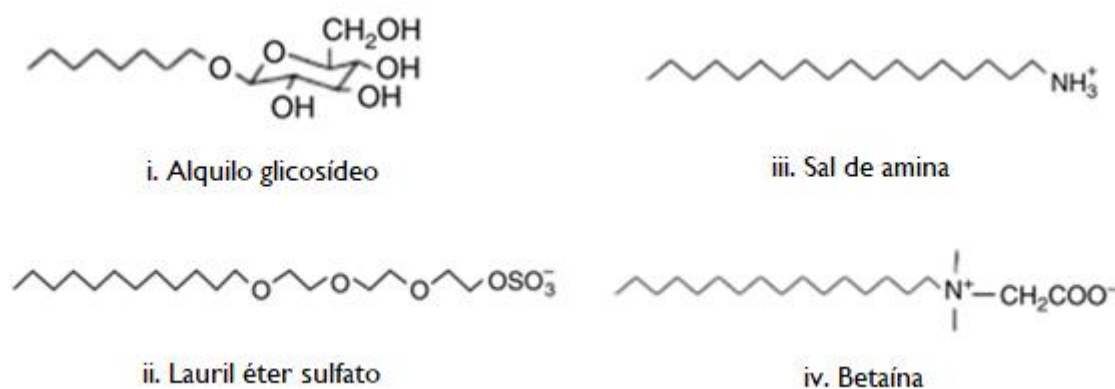
Os surfactantes podem classificar-se em não iónicos, catiónicos, aniónicos e zwitteriónicos consoante o tipo de grupo presente na região polar da molécula [20].

Os surfactantes não iónicos não se ionizam em água pois não possuem carga eletrónica, a sua solubilidade deve-se à hidratação dos grupos hidrofílicos, conferindo à molécula elevada polaridade [20]. Alguns exemplos de surfactantes não iónicos incluem o Tween 80, o PEG 6000 e o Koplliphor P407 Micro.

Os surfactantes aniónicos possuem grupos carregados negativamente e são estes que lhes conferem a parte hidrofílica [20], um exemplo é o lauril sulfato de sódio (SLS). Por outro lado, os surfactantes catiónicos apresentam na sua estrutura moléculas carregadas positivamente [20]. Os surfactantes catiónicos são normalmente incompatíveis com surfactantes aniónicos, dado que as cargas contrárias das moléculas reagem entre si, formando um composto insolúvel [20].

Os surfactantes zwitteriónicos alteram a sua carga consoante o pH da solução, estes podem ser uma combinação de grupos com carga negativa, positiva ou sem carga [20].

Como referido previamente as características do grupo polar definem o tipo de surfactante, desta forma, exemplos de cada tipo de surfactante estão representados na Figura 5.



**Figura 5.** Estrutura de diferentes tipos de surfactantes: i. surfactante não iónico (alquilo glicosídeo), ii. surfactante aniónico (lauril éter sulfato), iii. surfactante catiónico (sal de amina) e iv. surfactante zwitteriónico (betaína).

Adaptado de [20].

#### 2.5.2.4. Aplicações dos Surfactantes

Os surfactantes são usados em formulações para solubilizar substâncias ativas pouco solúveis em água, visto que têm a capacidade de formar micelas em solução aquosa. Desta forma, a substância ativa fica aprisionada no interior hidrofóbico do surfactante, ao passo que a parte hidrofílica do surfactante fica em contacto com a solução aquosa.

Para além das propriedades de melhoramento da solubilidade, os agentes tensioativos podem produzir um efeito substancial na absorção e metabolismo da substância medicamentosa [13]. Estes são também amplamente utilizados na indústria devido às suas propriedades de formação de espumas/detergentes e emulsificantes [20,25].

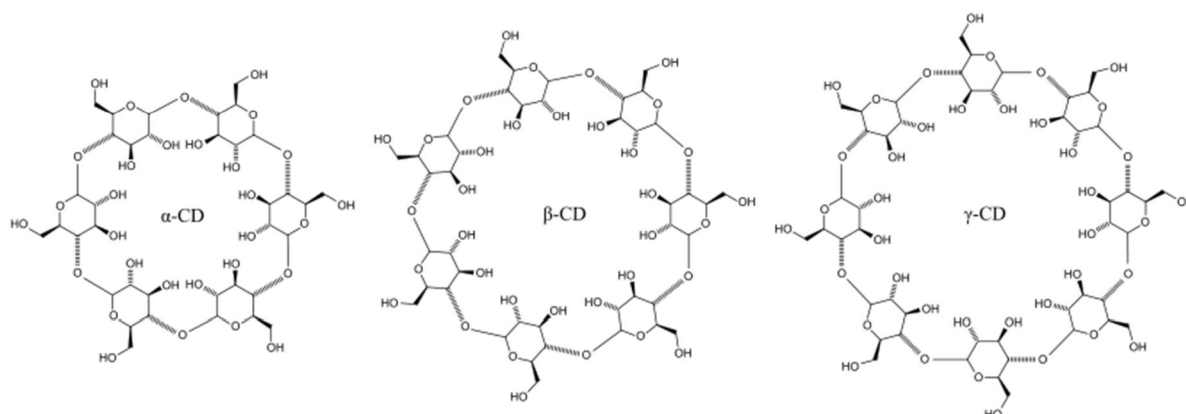
Um elevado número de surfactantes tem sido usado em diferentes formas farmacêuticas, contudo, os surfactantes são raramente utilizados como o único agente solubilizante, quer em formulações líquidas quer em formulações sólidas. Neste tipo de estratégias os surfactantes são utilizados em conjunto com outras abordagens que incluem co-solventes, lípidos e/ou alterações de pH [18].

#### 2.5.3. Ciclodextrinas

##### 2.5.3.1. Estrutura e Propriedades

As ciclodextrinas (CD) são uma família de oligossacarídeos cíclicos obtidas pela degradação enzimática do amido pela enzima ciclodextrina glucanotransferase (CGTase) [26].

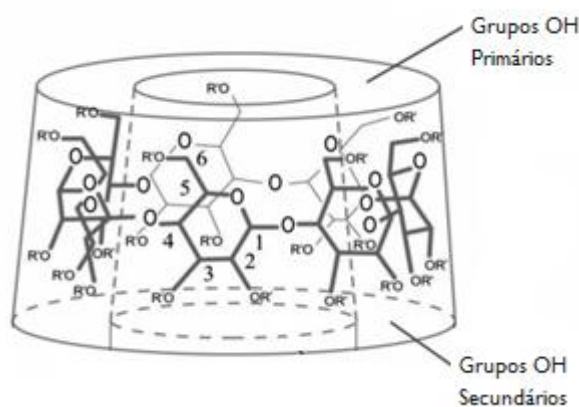
Existem três tipos principais de ciclodextrinas naturais:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD [26,27,28], com seis, sete e oito unidades de glicose, respetivamente, representadas na Figura 6. Estas substâncias são cristalinas e as propriedades físico-químicas diferem entre si, sobretudo ao nível da solubilidade aquosa.



**Figura 6.** Estrutura química das ciclodextrinas naturais:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD.

Adaptado de [27].

Molecularmente as ciclodextrinas caracterizam-se por unidades repetidas do açúcar D-Glucopiranosose ligadas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4, que são responsáveis pela forma distinta de um cone truncado que elas adquirem [26]. Na Figura 7 está representada a estrutura em cone truncado da  $\beta$ -CD. Na extremidade mais larga, existem grupos hidroxilo (OH) secundários, enquanto na extremidade mais estreita há grupos OH primários [26].



**Figura 7.** Representação da estrutura em cone truncado da  $\beta$ -CD.

Adaptado de [27].

Os grupos hidroxilo tornam a superfície externa da molécula hidrofílica, enquanto a cavidade interna é hidrofóbica. As ciclodextrinas são moléculas anfífilas, porque o seu interior é hidrofóbico e seu exterior é hidrofílico. O interior hidrofóbico das

ciclodextrinas permite a inclusão de compostos hidrofóbicos, como o caso de substâncias ativas pouco solúveis em água, aumentando a sua solubilidade [28].

#### 2.5.3.2. Derivados

No geral, as ciclodextrinas naturais têm uma solubilidade limitada em solução aquosa [29], limitando a sua aplicação como agente solubilizante. Este facto ocorre especialmente para o caso da  $\beta$ -CD em que a sua baixa solubilidade em solução aquosa é devida à ligação de hidrogénio intramolecular entre os grupos hidroxilo secundários, o que torna a estrutura molecular rígida, impedindo a ligação de hidrogénio com a água [26].

A substituição de grupos hidroxilo por vários grupos funcionais, como metilo, etilo, carboximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo [27,30,31] permitem modificar as ciclodextrinas para obter derivados de ciclodextrinas por reações químicas e enzimáticas [31]. A modificação química dos grupos hidroxilo das ciclodextrinas resulta num aumento da sua solubilidade aquosa [30]. A comparação da solubilidade aquosa entre ciclodextrinas naturais e derivados de ciclodextrinas está representada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Comparação da solubilidade aquosa entre ciclodextrinas naturais e derivados de ciclodextrinas.

	$\alpha$ -CD	Trimetil- $\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	Dimetil- $\beta$ -CD	$\gamma$ -CD	Trimetil- $\gamma$ -CD
<b>Número de unidades de açúcar</b>	6	6	7	7	8	8
<b>Massa Molecular (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	972	1225	1135	1331	1297	1634
<b>Solubilidade aquosa (g/100 ml at 25 ° C)</b>	14,5	20,0	1,85	57	23,2	48

Adaptado de [27].

A finalidade de utilizar derivados é aumentar a solubilidade e aumentar a capacidade de inclusão das ciclodextrinas naturais [27], daí o interesse destas substâncias a nível farmacêutico [27,31].

#### 2.5.3.3. Ciclodextrinas Aprovadas pela FDA

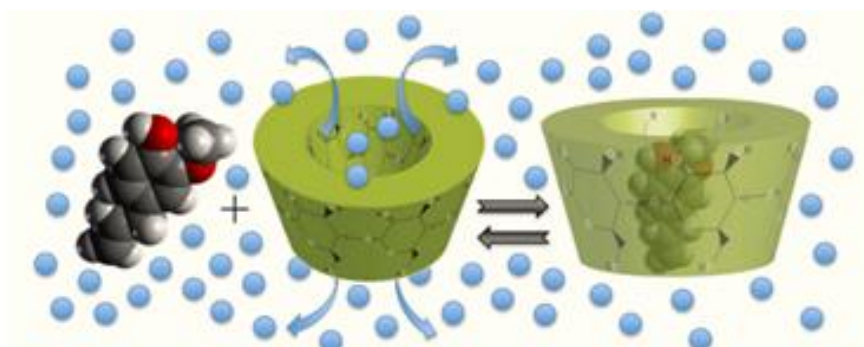
As ciclodextrinas aprovadas pela FDA para uso humano encontram-se descritas na lista de ingredientes inativos e correspondem à  $\beta$ -CD, Sulfobutiléter- $\beta$ -CD (SBE- $\beta$ -CD), Hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD),  $\gamma$ -CD e Hidroxipropil- $\gamma$ -CD (HP- $\gamma$ -CD) [32].

#### 2.5.3.4. Complexos de Inclusão

As ciclodextrinas têm a capacidade de formar complexos de inclusão [31]. Estes são formados por interações termodinâmicas estáveis, em que a principal força motriz para a sua formação é a libertação de moléculas de água da cavidade interior devido à aproximação do fármaco/soluto da ciclodextrina. O complexo de inclusão formado fica em equilíbrio dinâmico reversível devido a diferentes tipos de interações, como forças de van der Waals, interações eletrostáticas e ligações de hidrogénio [30], com o complexo de fármaco livre, CD livre e o fármaco complexado com a CD [27,33].

Geralmente, a molécula a ser complexada tem um carácter hidrofóbico, e portanto promove a repulsão entre a molécula de interesse e o meio aquoso. Durante o processo de complexação, ocorre uma diminuição dessa repulsão, culminando com a entrada gradual da molécula na cavidade da ciclodextrina [27,28].

As moléculas no interior da cavidade da ciclodextrina estão em equilíbrio dinâmico e o tipo de ciclodextrina pode influenciar a formação do complexo de inclusão, bem como a eficiência do complexo fármaco e ciclodextrina [30]. A formação de um complexo de inclusão entre uma ciclodextrina e uma molécula hidrofóbica em solução aquosa está representada na Figura 8.



**Figura 8.** Formação de um complexo de inclusão entre uma ciclodextrina e uma molécula hidrofóbica em solução aquosa. Adaptado de [26].

#### 2.5.3.4.1. Métodos de produção de complexos de inclusão

Os principais métodos de produção de complexos de inclusão são a co-precipitação, o sistema etanol-água, extrusão, evaporação de solvente, complexação rápida (*slurry*) e liofilização [34]. A escolha do método tem por base as propriedades da molécula a ser complexada e a formulação em desenvolvimento.

#### 2.5.3.4.2. Métodos para melhorar a complexação

A quantidade de ciclodextrina que pode ser incluída na maioria das formas farmacêuticas é limitada, uma vez que existem fatores como a toxicidade, o custo de produção e a biodisponibilidade do fármaco que limitam a utilização de elevadas quantidades de ciclodextrinas [35], e consequentemente, diminuem a eficácia/complexação destas moléculas.

Existem métodos para melhorar a complexação das ciclodextrinas [29] que estão relacionados com a solubilidade do fármaco [36]. Os métodos usados para melhorar a complexação são a ionização das moléculas do fármaco, a formação de sais e a adição de co-solventes [29,36]. Por exemplo, a adição de etanol como co-solvente pode promover a formação de complexos [34] e o PEG pode melhorar a solubilidade aquosa de substâncias ativas pouco solúveis em água [29,37].

#### 2.5.3.5. Agregação de Ciclodextrinas

As ciclodextrinas têm a desvantagem de formar agregados por intermédio das pontes de hidrogénio que se formam entre grupos hidroxilo. Quanto maior a quantidade de ciclodextrinas em solução, maior a tendência de haver formação de agregados [29]. Todas as ciclodextrinas têm tendência em formar agregados, contudo, esta é menos provável nos derivados de ciclodextrinas devido aos grupos funcionais presentes em torno da molécula [29,38]. Este fator reduz a capacidade das ciclodextrinas interagirem com moléculas pouco solúveis [29].



#### 2.5.3.6. Aplicações das Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são utilizadas em produtos cosméticos, processos de separação, têxtil e embalagem, alimentos e sabor, bem como em produtos farmacêuticos [29,31].

O uso de ciclodextrinas tem como vantagem aumentar a solubilidade aquosa e a biodisponibilidade, aumentar a estabilidade física e química da formulação, bem como melhorar as qualidades organoléticas (odor e/ou sabor) [28,39].

As ciclodextrinas desempenham um papel muito importante na formulação de fármacos pouco solúveis em solução aquosa, melhorando a solubilidade do fármaco através da complexação da substância ativa [29].

Atualmente, as ciclodextrinas podem ser encontradas em mais de 50 produtos farmacêuticos comercializados [29]. Um exemplo bem conhecido de um comprimido sublingual com ciclodextrina é o Nicorette<sup>®</sup> onde é usada a complexação com a  $\beta$ -CD para mascarar o gosto desagradável da nicotina e permitir a preparação de uma forma farmacêutica sublingual [40].

A técnica de *Higuchi e Connors* pode ser aplicada a estudos de solubilidade específicos, nomeadamente estudos de solubilidade de fase, para se determinar o perfil de solubilidade de uma molécula, uma vez que a solubilidade é determinada para soluções contendo concentrações crescentes do agente complexante [30]. Nestes casos, a solubilidade é representada graficamente em função da concentração de CD em solução [29]. Esta é a técnica mais comum utilizada em estudos que envolvem ciclodextrinas como estratégia de incremento da solubilidade.

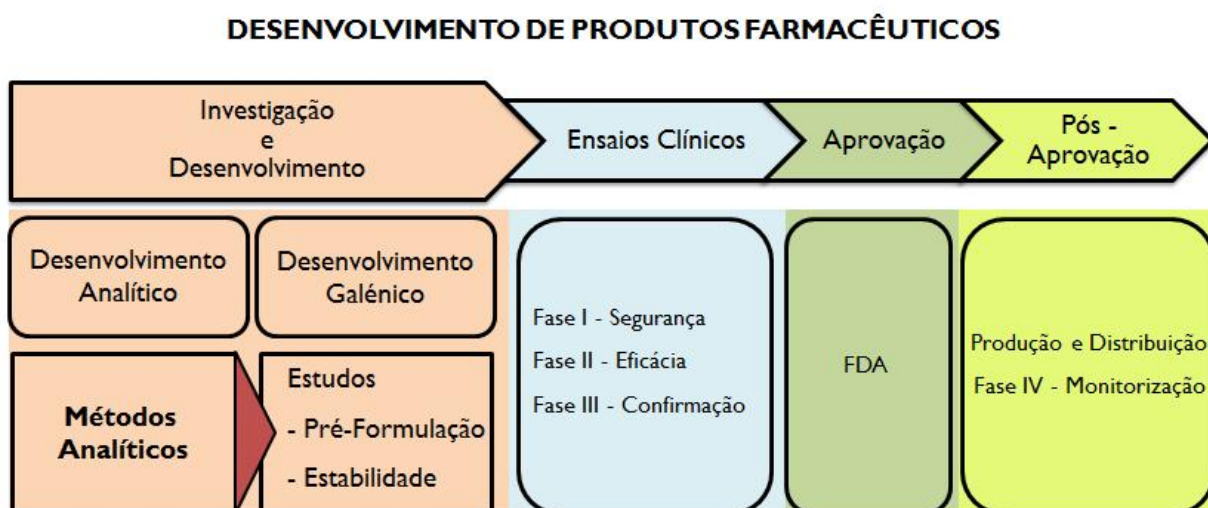
#### 2.5.4. Outras Estratégias

Uma alternativa às estratégias referidas é a utilização de nanopartículas, cuja vantagem é o aumento da área superficial e gradiente de concentração das substâncias ativas pouco solúveis [9]. A alteração do pH é também uma estratégia usada para aumentar a solubilidade de substâncias ativas pouco solúveis em solução aquosa, dado que as moléculas exibem solubilidade dependente do pH, e uma alteração neste permite aumentar a solubilidade das moléculas [19]. Por exemplo, a ciprofloxacina é uma

substância ativa praticamente insolúvel em água a pH neutro, contudo, a sua solubilidade é dependente do pH e a pH ácido esta molécula exibe maior solubilidade [19].

## 2.6. Desenvolvimento de Métodos Analíticos na Indústria Farmacêutica

O desenvolvimento de produtos farmacêuticos engloba várias etapas desde a investigação e desenvolvimento, realização de ensaios clínicos, submissão da molécula e aprovação pela FDA, comercialização e controlo após aprovação, como sumariado na Figura 9.



**Figura 9.** Etapas envolvidas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos: investigação e desenvolvimento, ensaios clínicos, aprovação e pós-aprovação.

Adaptado de [41].

No caso de medicamentos genéricos as etapas exigidas pelas autoridades para o seu desenvolvimento envolvem todas as requeridas ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos, com a exceção da etapa dos ensaios clínicos que é substituída pela verificação de bioequivalência através de estudos de biodisponibilidade, dado que para o medicamento inovador os ensaios clínicos foram efetuados para comprovarem a segurança e eficácia da molécula [41].

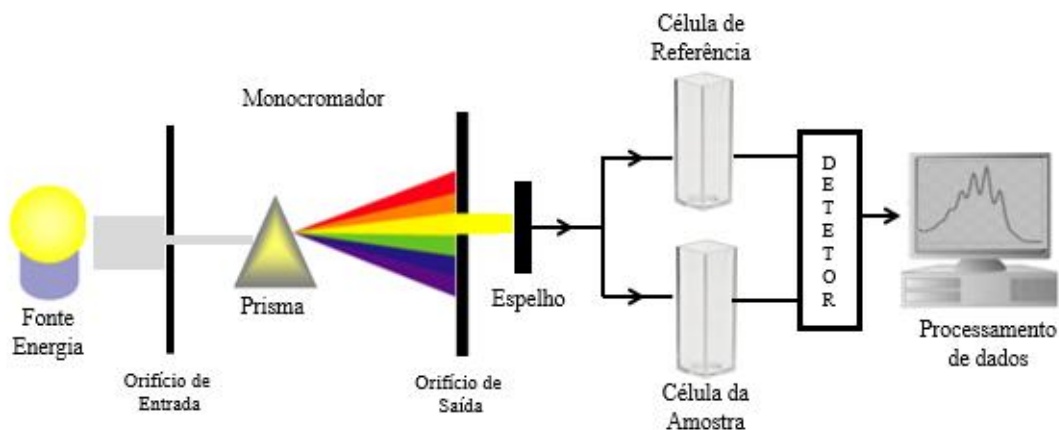
Na indústria farmacêutica o desenvolvimento de métodos analíticos e formulações galénicas desempenham um papel essencial no ciclo de vida de medicamentos inovadores

e genéricos. Para além destes, o desenvolvimento de produtos farmacêuticos envolve igualmente o aumento de escala que consiste na transposição da escala laboratorial para a escala industrial, bem como estudos de estabilidade conduzidos para determinar a qualidade da matéria-prima ou do produto medicamentoso.

O desenvolvimento de métodos analíticos constitui uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, dando resposta a estudos de pré-formulação e a estudos de estabilidade do produto em questão.

As técnicas analíticas mais comuns para a quantificação de substâncias ativas nas formulações farmacêuticas englobam a espectroscopia ultra-violeta (UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com deteção por arranjo fotodíodo (PDA).

A espectroscopia UV é uma técnica frequentemente usada em análises de produtos farmacêuticos. Os espectrofotómetros ultravioleta-visíveis (UV-Vis) são usados para medir a quantidade de radiação ultravioleta ou visível absorvida numa solução [42]. Os componentes principais dos espectrofotómetros UV-Vis são: fonte de energia, monocromador, recipiente onde é colocada a amostra para análise (célula ou cuvete), detetor e processador de dados [43], representados na Figura 10.



**Figura 10.** Esquematização dos componentes de um espectrofotómetro de duplo feixe.

Adaptado de [42].

Existem dois tipos de espectrofotómetros, os espectrofotómetros de feixe simples e os espectrofotómetros de duplo feixe, estes diferem em alguns aspetos, contudo, o princípio de funcionamento é idêntico em ambos.

O princípio de um espectrofotómetro UV-Vis de duplo feixe baseia-se num feixe de luz gerado na fonte de energia (normalmente lâmpadas de deutério ou tungsténio), que é

separado nos seus comprimentos de onda no monocromador, e origina um feixe monocromático, que por sua vez, é dividido em dois feixes de igual intensidade. Um dos feixes, designado de feixe da amostra, atravessa a cuvete que contém a solução do composto em estudo, enquanto o outro feixe, designado de feixe de referência, atravessa a cuvete que contém apenas o solvente, comumente referido como o branco numa análise de espectroscopia UV [43]. A cuvete de referência é utilizada para eliminar a radiação correspondente ao solvente utilizado na solução que contém a amostra, desta maneira é possível obter a radiação correspondente à amostra em estudo. As cuvetes usadas são, geralmente, de quartzo, dado que estas não absorvem radiação UV [43].

O espectrofotômetro mede a quantidade de radiação absorvida na célula de referência e na célula da amostra em cada comprimento de onda. A intensidade da radiação antes de atravessar a célula é designada por radiação incidente,  $I_0$ , e a intensidade da radiação após atravessar a mostra é designada por radiação transmitida,  $I$ . A razão entre a radiação transmitida e a radiação incidente é definida como transmitância. A transmitância pode ser expressa em termos de absorvância (Abs), de acordo com a equação 1.

$$\text{Abs} = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) \quad (1)$$

Onde:

Abs é a absorvância.

$I_0$  é a intensidade da radiação incidente.

$I$  é a intensidade da radiação transmitida.

Segundo a Lei de Beer-Lambert, a absorvância é proporcional à concentração da substância em solução e, como resultado, a espectroscopia UV-Vis pode ser usada para medir a concentração de uma amostra [43].

A Lei de Beer-Lambert pode ser expressa como descrito na equação 2.

$$\text{Abs} = \epsilon c l \quad (2)$$

Onde:

Abs é a absorvância.

$\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar ( $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

c é a concentração da amostra ( $\text{mol/L}$ ).

l é o comprimento do percurso ótico (cm).

O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) é constante para uma determinada substância num determinado comprimento de onda, enquanto o comprimento do percurso ótico (l) corresponde à dimensão da célula ou cuvete [43].

As intensidades dos feixes de radiação são convertidas em sinal elétrico através de detetores. Os detetores de espectrofotómetros UV-Vis são, geralmente, fotomultiplicadores ou fotodíodos, sendo que estes variam na gama de deteção dos comprimentos de onda. Os detetores de cada espectrofotómetro têm uma gama de absorvâncias para os quais é garantida uma resposta linear. Desta forma, os comprimentos de onda escolhidos para quantificar as amostras devem ter em consideração valores de absorvância que não comprometam a resposta do detetor [43]. Os detetores geram um espectro de absorvância ou transmitância, através do qual é possível obter a absorvância da solução e quantificar a amostra em estudo.

A espectroscopia UV-Vis foi escolhida como técnica para o desenvolvimento de métodos analíticos do presente projecto. Esta técnica permite a quantificação de substâncias ativas tendo como principais vantagens: rapidez, baixo custo e facilidade de utilização relativamente a outras técnicas usadas na indústria farmacêutica, como por exemplo a técnica de HPLC.

Os métodos analíticos devem ser simples e robustos, e cumprir com as diretrizes das agências reguladoras, daí a necessidade de serem validados, como discutido em seguida.

## 2.7. Validação de Métodos Analíticos

O desenvolvimento analítico, em grande parte dos casos, tem como objetivo final a definição de um método rigoroso, preciso e robusto para ser aplicado nos laboratórios de controlo de qualidade. Neste sentido, existe a necessidade de demonstrar laboratorialmente que o método reúne todas as características necessárias para essa

aplicação. Desta forma, os métodos analíticos são submetidos a um processo de validação, que engloba um conjunto de testes onde são cumpridos critérios específicos.

Tal como referido na *guideline* ICH Q2(R1), a validação analítica diz respeito ao “processo de demonstração de que os procedimentos analíticos são adequados para o uso pretendido” [44].

O processo de validação analítica é contínuo e deve ser considerado ao longo do ciclo de vida do método analítico. A validação analítica deve ser considerada para novos desenvolvimentos e periodicamente para métodos já validados e em uso nas rotinas laboratoriais de forma a demonstrar/avaliar se o método continua adequado. Adicionalmente, é mandatário proceder à revalidação de métodos analíticos quando são introduzidas alterações críticas, como por exemplo, alteração do processo de síntese da substância ativa, alterações na composição do produto acabado e/ou alteração de parâmetros cromatográficos como a alteração da coluna cromatográfica, alteração na composição da(s) fase(s) móvel(eis), entre outros.

De acordo com a *guideline* ICH Q2(R1) existem quatro tipos de métodos que requerem validação [44]:

- (i) Testes de identificação;
- (ii) Testes quantitativos para determinação de impurezas;
- (iii) Testes limite para o controlo de impurezas;
- (iv) Testes quantitativos para determinação da substância ativa em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.

Os testes de identificação são realizados com o objetivo de demonstrar a identidade de um analito numa amostra que contem outros compostos, alguns dos quais com estrutura similar ao do analito de interesse. As técnicas mais comuns utilizadas para esta finalidade incluem a espectroscopia UV, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e HPLC. Geralmente estes métodos baseiam-se na comparação do espectro da amostra teste com o espectro de um padrão de referência. Desta forma a validação analítica deve demonstrar a capacidade do método desenvolvido em distinguir compostos com estrutura similar expectáveis de estarem presentes nas amostras.

Os testes de impurezas podem ser quantitativos ou de limite, porém, ambos têm o propósito de controlar os níveis de impurezas da amostra, dado que as impurezas,

também designadas de substâncias relacionadas, são produtos resultantes da degradação da substância ativa como consequência de alterações químicas do princípio ativo, e que consequentemente, podem influenciar a eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos. Em consequência das impurezas surgirem em níveis muito baixos são necessários métodos de análise sensíveis e específicos para determinar os seus níveis, por isso, esta avaliação é normalmente realizada através da quantificação por HPLC ou Cromatografia Gasosa (GC).

Os testes de quantificação ou testes de conteúdo são usados para medir o analito presente numa dada amostra e a sua quantificação pode ser realizada por espectroscopia UV ou HPLC.

Na Tabela 3 é apresentado um quadro síntese que indica os parâmetros de validação a analisar consoante o tipo de ensaio.

**Tabela 3.** Parâmetros de validação a analisar para ensaios de identificação, impurezas e conteúdo.

Tipo de Ensaio Parâmetros	Identificação	Impurezas		Conteúdo
		Quantificação	Limite	
Exatidão	-	+	-	+
Precisão - Repetibilidade	-	+	-	+
Limite de Detecção	-	-	+	-
Limite de Quantificação	-	+	-	-
Especificidade	+	+	+	+
Linearidade	-	+	-	+
Gama	-	+	-	+

(+) Característica normalmente avaliada;

(-) Característica normalmente não avaliada;

Adaptado de [44].

Neste projeto foram desenvolvidos diferentes métodos analíticos por espectroscopia UV-Vis para a quantificação de várias substâncias ativas pertencentes a diferentes classes BCS, tendo sido validados os parâmetros requeridos para o ensaio de conteúdo.

### 3. Objetivos

O objetivo do presente projeto, inserido no Mestrado de Biotecnologia Molecular, engloba o desenvolvimento de métodos analíticos para dar suporte ao desenvolvimento de novas formas farmacêuticas orais líquidas não estéreis, no âmbito dos projetos em fase de desenvolvimento pela equipa de Investigação e Inovação da Bluepharma.

Deste modo um dos objetivos consistiu no desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos, rigorosos e precisos que permitissem a quantificação de substâncias ativas pertencentes a diferentes classes biofarmacêuticas, segundo o sistema BCS.

Em paralelo ao desenvolvimento dos métodos analíticos, outro objetivo relacionou-se com a implementação/avaliação de diferentes estratégias para aumentar a solubilidade das substâncias ativas, com o objetivo de serem incorporadas numa nova forma farmacêutica oral, e para as quais foram desenvolvidos os métodos de quantificação.



## 4. Desenvolvimento e Validação de Métodos por Espectroscopia UV-Vis

Neste capítulo será apresentada a descrição do trabalho experimental realizado no âmbito do desenvolvimento de métodos analíticos, para a quantificação de substâncias ativas pertencentes a diferentes classes biofarmacêuticas, as quais foram incorporadas numa forma farmacêutica inovadora. Esta abordagem foi utilizada com o intuito de averiguar a versatilidade da formulação para incorporar substâncias ativas de diferentes classes biofarmacêuticas, e ao mesmo tempo dar suporte ao desenvolvimento da formulação, uma vez que desta forma é assegurada a correta quantificação das substâncias ativas na formulação inovadora.

### 4.1. Experimental

#### 4.1.1. Materiais

Neste trabalho foram utilizadas 4 substâncias ativas de diferentes classes biofarmacêuticas: substância ativa de classe BCS I, BCS II, BCS III e BCS IV adquiridas a diferentes fornecedores. As diferentes substâncias ativas foram incorporadas numa formulação farmacêutica inovadora, desenvolvida internamente.

Todos os reagentes químicos utilizados durante o desenvolvimento e o processo de validação da metodologia analítica são adequados a análises por espectroscopia UV-Vis. O metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) foi adquirido à Merck, o acetonitrilo (ACN) à VWR, o ácido clorídrico (HCl) 37 % à VWR e a água ultrapura ( $\text{H}_2\text{O}$  u.p.) foi obtida internamente através do sistema de purificação Milli-Q® Advantage A10.

#### 4.1.2. Equipamentos

Para o desenvolvimento dos métodos analíticos recorreu-se a instrumentação analítica qualificada e calibrada de acordo com os requisitos das entidades reguladoras, nomeadamente, balança analítica (Mettler Toledo, XS205DU), microbalança (Sartorius, MSA6.6S), ultrassons (Bandelin, Sonorex Super), centrífuga (VWR, himac CT6E) e

espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe (Analytik Jenna, Specord 210 Plus) com o suporte lógico WinASPECT® PLUS.

#### 4.1.3. Desenvolvimento de Métodos Analíticos

O desenvolvimento de métodos analíticos é fundamental para demonstrar a adequabilidade de um método na obtenção de resultados analíticos, considerando que o principal objetivo de um método analítico é fornecer dados confiáveis e precisos.

Neste projeto foi desenvolvido um método analítico por espectroscopia UV-Vis para cada uma das substâncias ativas (Classe BCS I, II, III e IV), incorporadas numa formulação em desenvolvimento na Bluepharma, com o intuito de demonstrar a sua versatilidade. A composição percentual da formulação engloba 6,66% de substância ativa e 93,34% de protótipo (FT 248) para cada uma das moléculas estudadas.

O desenvolvimento de um método analítico inclui a preparação das amostras, à temperatura ambiente do laboratório (20 a 23°C), bem como a definição das condições espectrofotométricas para a detecção e quantificação da substância ativa. O espectrofotômetro utilizado é constituído por um sistema ótico de duplo feixe. Foram utilizadas células de 1 cm de largura e a gama de detecção dos comprimentos de onda analisados foi entre 190 - 400 nm. O suporte lógico usado para o controlo, monitorização, aquisição e exportação de dados foi o WinASPECT® PLUS.

No desenvolvimento de cada um dos métodos foram otimizados os seguintes parâmetros: escolha do solvente; escolha da concentração de trabalho e seleção do comprimento de onda.

Para a escolha do solvente de cada método procedeu-se à preparação de soluções com a substância ativa. As soluções foram submetidas a 10 minutos no ultrassons, para garantir a total dissolvência das moléculas, sendo posteriormente avaliada visualmente a presença ou ausência de partículas dissolvidas.

Para a escolha da concentração de trabalho foram preparadas soluções padrão de substância ativa. As soluções padrão das substâncias ativas das classes BCS I e III foram preparadas a uma concentração de 0,04 mg/mL. No caso da solução padrão da substância ativa da classe BCS II foi preparada a uma concentração de 0,02 mg/mL e finalmente, no caso da substância ativa da classe BCS IV, a solução padrão foi preparada a 0,03 mg/mL.

O comprimento de onda foi selecionado para cada método tendo em conta os resultados do parâmetro especificidade.

#### 4.1.4. Parâmetros de Validação de Métodos Analíticos

É fundamental que os métodos analíticos a desenvolver cumpram critérios objetivos, para demonstrarem, através da validação, que estes conduzem a resultados credíveis, rigorosos e adequados ao seu propósito.

As metodologias analíticas desenvolvidas foram validadas de acordo com o estabelecido na *guideline* ICH Q2(R1) e nas farmacopeias aplicáveis, Farmacopeia dos Estados Unidos (USP) e Farmacopeia Europeia (EU).

Os parâmetros de validação usados para a metodologia analítica por espectroscopia UV-Vis para as diferentes substâncias ativas foram a especificidade, precisão do sistema, linearidade e exatidão, descritos detalhadamente em seguida.

##### 4.1.4.1. Especificidade

A especificidade é definida como a “*capacidade de um método distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros constituintes da mistura como impurezas e/ou produtos de degradação e excipientes*” [44].

Para testar este parâmetro procedeu-se á preparação das soluções referentes ao solvente, mistura de excipientes, solução padrão contendo a SA na concentração de trabalho do método (concentração definida durante o desenvolvimento) e a solução de fórmula reconstituída (RF) - SA e excipientes. Todas as soluções foram preparadas para o mesmo nível de concentração.

A especificidade foi avaliada através das interferências calculadas correspondentes à interferência dos excipientes e da interferência da fórmula reconstituída.

##### 4.1.4.2. Precisão do Sistema

A precisão do sistema é um termo geral para a “*avaliação da dispersão de resultados entre uma série de medições obtidas a partir de múltiplas análises da mesma solução*” [44]. A

dispersão de diferentes medições de uma mesma amostra homogênea foi avaliada com base no valor de desvio padrão relativo (RSD) das absorvâncias obtidas em 6 medições consecutivas de uma solução padrão contendo cada substância ativa na concentração de trabalho.

#### 4.1.4.3. Linearidade

A linearidade de um método caracteriza-se pela “*relação de proporcionalidade da resposta obtida face à concentração da amostra analisada, dentro de um intervalo específico*” [44].

A linearidade determinou-se para cada método através da preparação de cinco soluções de SA a 60 %, 80 %, 100 %, 120 % e 140 % da concentração de trabalho do método.

A avaliação da linearidade foi realizada com recurso a análise por regressão linear através dos parâmetros: ordenada na origem, declive da reta de regressão, coeficiente de correlação ( $r$ ) (desvio dos pontos da reta de regressão) e da soma dos resíduos quadrados, calculados pelo método dos mínimos quadrados.

#### 4.1.4.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico “*expressa a concordância entre o valor obtido pelo método analítico e o valor considerado como convencionalmente verdadeiro (valor teórico)*” [44].

A concordância entre a concentração obtida e a concentração teórica de cada SA foi determinada para três soluções teste de fórmula reconstituída preparadas independentemente com a SA no nível da concentração de trabalho e os excipientes na concentração correspondente à proporção na formulação. Preparou-se uma calibração com duas soluções padrão contendo a SA na concentração de trabalho do método e a exatidão foi avaliada contra a calibração, tendo em conta a percentagem de recuperação da quantidade de SA existente na amostra, o desvio padrão (SD), o RSD e o intervalo de confiança a 95 % (IC 95 %) para cada amostra.

#### 4.1.4.5. Gama

A gama de um método analítico é o “intervalo entre a concentração superior e inferior do analito na amostra (incluindo estas concentrações) para a qual foi demonstrado que o procedimento analítico tem um nível adequado de precisão, linearidade e exatidão” [44].

A gama dos métodos analíticos foi apenas avaliada entre um intervalo superior e inferior para o parâmetro linearidade.

#### 4.1.5. Critérios de Aceitação de Parâmetros de Validação de Métodos Analíticos

Os parâmetros de validação realizados e os seus critérios de aceitação (CA) estão tabelados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Critérios de aceitação dos parâmetros de validação: especificidade, precisão de sistema, linearidade e exatidão para métodos analíticos UV-Vis desenvolvidos para a quantificação de uma substância ativa no produto medicamentoso.

Parâmetros	Critérios de Aceitação
Especificidade	Interferências $\leq 2 \%$
Precisão do Sistema	RSD (n=6) $\leq 2 \%$
Linearidade	Percentagem na Ordenada na Origem $\leq 3 \%$
	Coeficiente de correlação $\geq 0,997$
Exatidão	Recuperação da amostra (n=3): 98 % - 102 %
	RSD da amostra (n=3): $\leq 2 \%$

Os critérios de aceitação foram definidos internamente de acordo com um procedimento operacional padrão. Estes têm de ser cumpridos para que o método analítico possa ser considerado validado e assim adequado para o seu propósito.

Neste projeto, os métodos analíticos vão permitir a quantificação das diferentes substâncias ativas numa formulação inovadora em desenvolvimento.

## 4.2. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados do desenvolvimento e validação dos métodos analíticos desenvolvidos para a quantificação das diferentes substâncias ativas. Inicialmente, serão discutidos os requisitos principais para o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação do conteúdo em substância ativa por espectroscopia UV-Vis e posteriormente proceder-se-á à apresentação dos resultados de validação obtidos para os diferentes métodos desenvolvidos.

### 4.2.1. Desenvolvimento de Métodos Analíticos por Espectroscopia UV-Vis

No desenvolvimento de métodos analíticos por espectroscopia UV-Vis para as substâncias ativas pertencentes às diferentes classes, a primeira abordagem foi comum a todas as moléculas e está relacionada com a escolha do solvente, concentração de trabalho e comprimento de onda.

#### 4.2.1.1. Escolha do solvente

A seleção do solvente visa a completa solubilização da substância ativa em questão, e assim, a sua escolha deve basear-se nas propriedades físico-químicas das moléculas a solubilizar. Na seleção do solvente foi tida em consideração a informação contida no *Drug Master File* (DMF) das substâncias ativas a serem testadas. O DMF é um documento elaborado pelo fabricante da substância ativa que resume toda a informação técnica e de qualidade relativa ao fabrico e caracterização da mesma. É um documento com grande peso regulamentar. A informação nele contida, incluindo propriedades físico-químicas, solubilidade em diferentes solventes, métodos analíticos utilizados empregues na caracterização das substâncias ativas, é submetida para apreciação por parte das autoridades reguladoras competentes do mercado a que se destina a substância ativa.

Adicionalmente, foram consultadas as monografias da USP para cada uma das substâncias ativas, onde também se podem encontrar informações técnicas relativas à

caracterização das substâncias ativas, qual a forma farmacêutica em que se encontram as substâncias ativas ou e quais os compostos disponibilizados comercialmente.

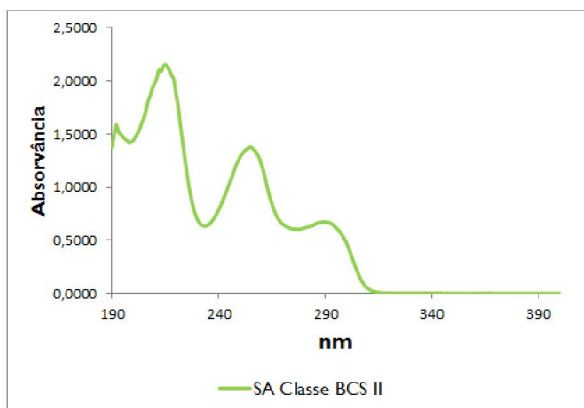
Em conjunto, as informações recolhidas das fontes acima mencionadas foram utilizadas como ponto de partida para a seleção do solvente do método analítico. Desta forma, para a substância ativa de classe BCS I o solvente escolhido foi uma mistura de ACN e H<sub>2</sub>O u.p. na proporção (30:70, v/v) e no caso da substância ativa de classe BCS II foi utilizada uma mistura ACN e H<sub>2</sub>O u.p. (50:50, v/v). Para as substâncias ativas das classes BCS III e IV foi utilizado o metanol como componente orgânico do solvente. A substância ativa de classe BCS III foi dissolvida numa mistura de HCl 0,1 N e CH<sub>3</sub>OH (50:50, v/v) e por fim, para a substância ativa de classe BCS IV foi utilizado como solvente a mistura CH<sub>3</sub>OH e H<sub>2</sub>O u.p. (10:90, v/v).

Os solventes referidos foram selecionados uma vez que, para todos os casos em estudo, foi possível obter a completa e rápida solubilização das substâncias ativas e das formulações recorrendo ao tratamento das amostras com apenas 10 minutos de ultrassons (procedimento usual de extração/solubilização). Adicionalmente, os solventes asseguram também a estabilidade física das soluções mais especificamente, asseguram que as substâncias ativas se mantêm solubilizadas durante, pelo menos, o decorrer da análise.

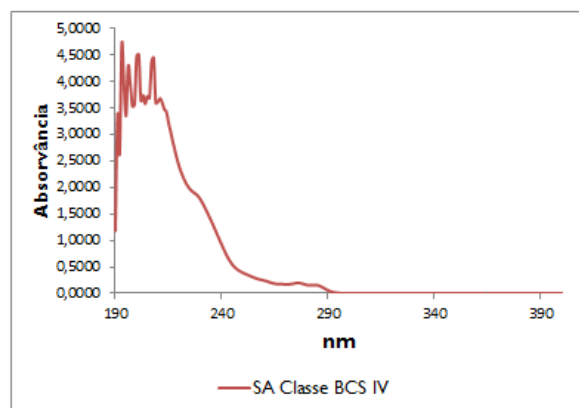
#### 4.2.1.2. Escolha da concentração de trabalho

Um parâmetro fundamental no desenvolvimento de métodos analíticos é a concentração de trabalho ou a concentração a 100%, dado que esta corresponde à dosagem da SA no produto final. A concentração de trabalho foi definida para cada método, de forma, a que esta permitisse obter um sinal adequado (1 unidade de absorvância) para comprimentos de onda superiores aos 200 nm uma vez que a interferência do solvente, principalmente do componente orgânico do solvente, é muito superior para comprimentos de onda inferiores a 200 nm.

Através da análise dos espectros representados nas Figuras 11 e 12 é possível concluir que a concentração de trabalho definida para a SA de classe BCS II a 0,02 mg/mL e para a SA de classe BCS IV a 0,03 mg/mL o sinal obtido é adequado, uma vez que existem valores de absorvância próximos de 1,0 para os quais é possível selecionar mais do que um comprimento de onda.

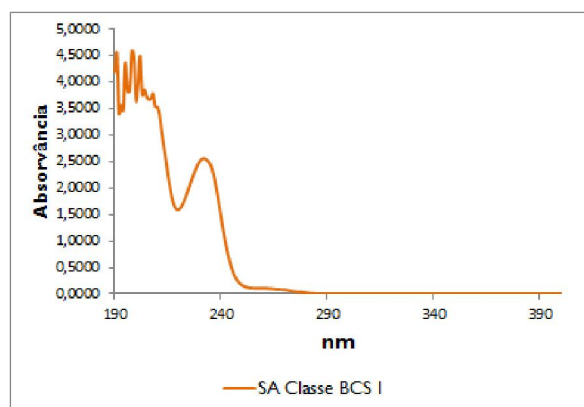


**Figura 11.** Espectro da solução de SA classe BCS II a 0,02 mg/mL.

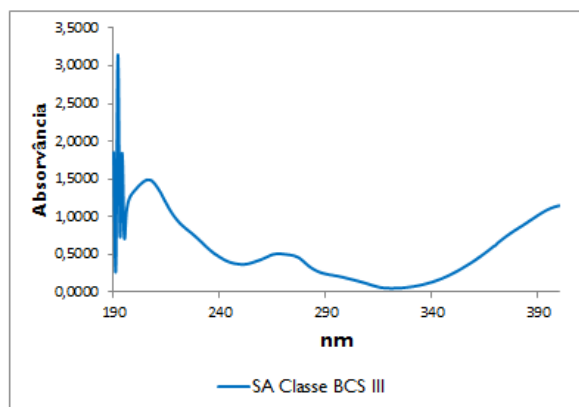


**Figura 12.** Espectro da solução de SA classe BCS IV a 0,03 mg/mL.

No caso das SA de classe BCS I e BCS III, foram inicialmente preparadas soluções com uma concentração de 0,08 mg/mL e 0,02 mg/mL, respetivamente. Os espectros destas soluções encontram-se representados nas Figuras 13 e 14, respetivamente.



**Figura 13.** Espectro da solução de SA classe BCS I a 0,08 mg/mL.

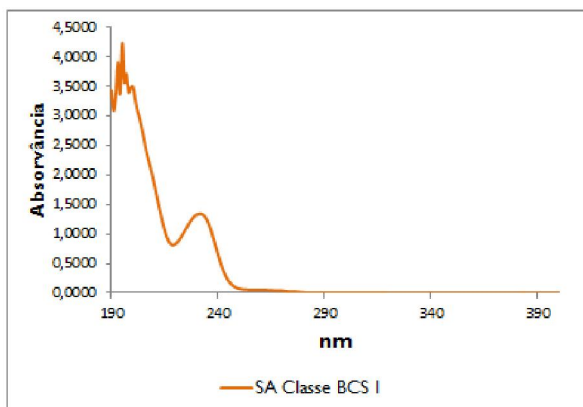


**Figura 14.** Espectro da solução de SA classe BCS III a 0,02 mg/mL.

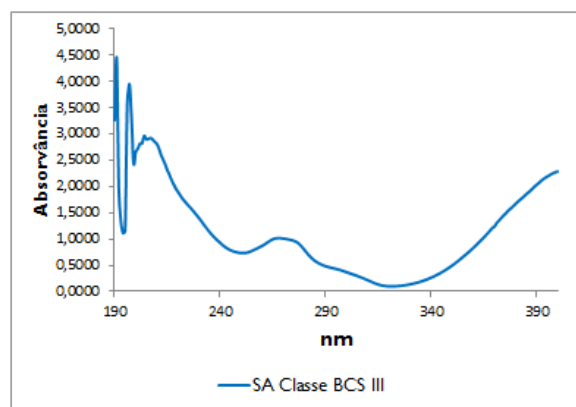
Da análise dos espectros das soluções padrão representados nas Figura 13 e 14, concluiu-se a necessidade de proceder ao ajuste das concentrações de trabalho para a solução de substância ativa de classes BSC I, uma vez que para os comprimentos de onda entre 230 e 240 nm os valores de absorvância são cerca de 2,0, e para a SA de classe BCS III, dado que para os comprimentos de onda entre 250 e 270 nm, os valores de absorvâncias são próximos de 0,5. A concentração da solução contendo a SA da classe BSC I foi reduzida de 0,08 mg/ml para 0,04 mg/ml e para a SA de classe BSC III foi



aumentada de 0,02 mg/ml para 0,04 mg/ml de forma a obter-se um sinal adequado (1 unidade de absorvância). Os espectros das soluções de SA de classe BCS I e III encontram-se representados nas Figuras 15 e 16, respetivamente.



**Figura 15.** Espectro da solução de SA classe BCS I a 0,04 mg/mL.



**Figura 16.** Espectro da solução de SA classe BCS III a 0,04 mg/mL.

Desta forma, as moléculas de SA de classes BCS I e BCS III a 0,04 mg/mL apresentam valores de absorvância próximos de 1,0, permitindo a seleção de diferentes comprimentos de onda e a obtenção de um método sensível para as moléculas em análise.

#### 4.2.1.3. Seleção do comprimento de onda

Para além dos critérios descritos anteriormente, outro critério essencial no desenvolvimento da metodologia analítica por UV-Vis consiste na identificação do comprimento de onda, ao qual vão ser avaliados os parâmetros do método e posterior quantificação das moléculas. Este requisito está relacionado com um dos parâmetros da validação, a especificidade, dado que para a sua escolha deve ser selecionado o comprimento de onda para o qual a interferência dos excipientes seja mínima. Deve ser tido também em consideração, que para um determinado comprimento de onda, os valores de absorvância devem ser próximos de 1,0, uma vez que o espectrofotómetro usado apresenta uma gama linear máxima até 3 unidades de absorvância, demonstrada através de qualificação realizada para este equipamento. Se os valores de absorvância

excederem o valor de 3,0, significa que as absorvâncias obtidas exprimem valores fora da resposta linear do detetor, inviabilizando os resultados que se pretendem rigorosos e precisos.

Outro cuidado a ter na seleção do comprimento de onda, de forma a mitigar variabilidade, consiste em selecionar uma gama de comprimentos de onda onde pequenas variações de  $\pm 2$  nm não induzem uma grande alteração da resposta.

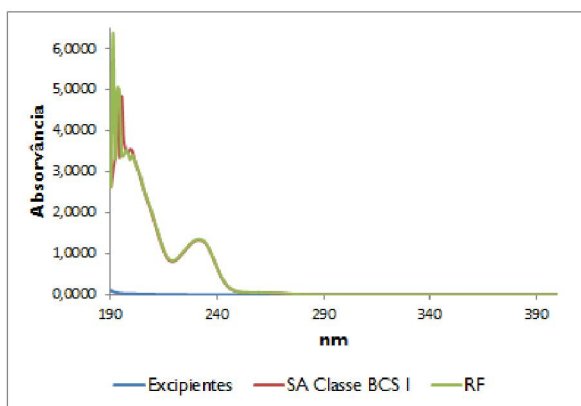
Os resultados do comprimento de onda selecionado para cada método encontram-se descritos em seguida no ponto (4.2.2.1.).

#### 4.2.2. Parâmetros de Validação de Métodos Analíticos

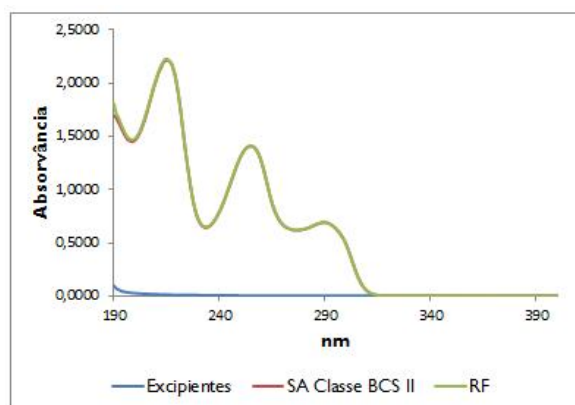
A análise dos resultados dos parâmetros de validação dos métodos analíticos serão discutidos em seguida para as substâncias ativas de classe BCS I, BCS II, BCS III e BCS IV.

##### 4.2.2.1. Especificidade

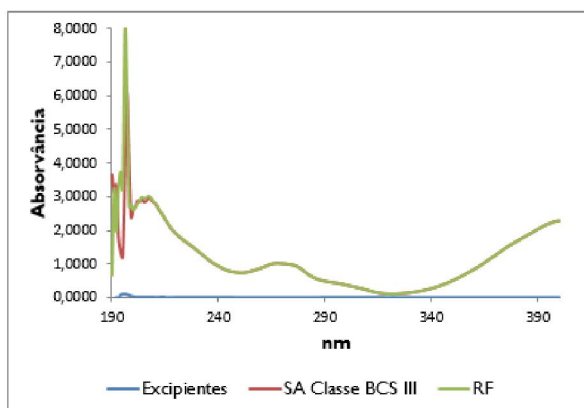
Os espectros obtidos para as soluções de excipientes, padrão de SA e fórmula reconstituída foram sobrepostos e estão representados para as substâncias ativas de classe BCS I, BCS II, BCS III e BCS IV, nas Figuras 17, 18, 19 e 20, respetivamente.



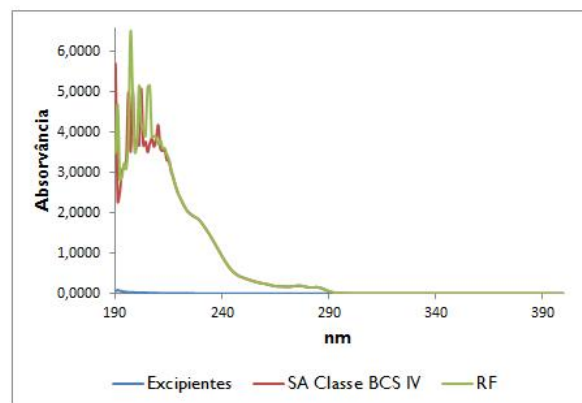
**Figura 17.** Sobreposição de espectros de soluções de excipientes, SA classe BCS I e RF.



**Figura 18.** Sobreposição de espectros de soluções de excipientes, SA classe BCS II e RF.



**Figura 19.** Sobreposição de espectros de soluções de excipientes, SA classe BCS III e RF.



**Figura 20.** Sobreposição de espectros de soluções de excipientes, SA classe BCS IV e RF.

Os espectros das soluções de excipientes, SA e RF foram obtidos contra o branco/solvente e o sinal adquirido corresponde aos constituintes das soluções, ou seja, à mistura de excipientes, SA e fórmula reconstituída, respetivamente.

A partir da análise dos espectros é possível identificar e distinguir as substâncias ativas dos restantes componentes da formulação, uma vez que o espectro correspondente à solução de excipientes, não está sobreposto com o espectro da solução de SA, significando que os excipientes não absorvem nos comprimentos de onda analisados, daí o sinal obtido para o espectro da solução de excipientes para todas as moléculas apresentar valores de absorvância próximos de 0,0. A sobreposição dos espectros das soluções de SA e fórmula reconstituída confirmam o facto de os excipientes não interferirem com a deteção da SA.

Foram selecionados os comprimentos de ondas cuja absorvância era aproximadamente igual a 1,0 e, para estes, foi avaliada a percentagem de interferência dos excipientes e da fórmula reconstituída, de acordo com as equações 3 e 4, respetivamente. Os dados para estabelecer os resultados das interferências 1 e 2 para as SA de classe BCS I, II, III e IV apresentam-se, respetivamente, nas Tabelas I, II, III e IV em Anexo.

$$\% \text{ Interferência 1} = \frac{Abs_{excip}}{Abs_{st}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

$Abs_{excip}$  é a absorvância da mistura de excipientes.

$Abs_{st}$  é a absorvância da solução padrão.

$$\% \text{ Interferência 2} = \left| \left( \frac{Rf_{RF}}{Rf_{st}} \times 100 \right) - 100 \right| \quad (4)$$

Onde:

$Rf_{RF}$  é o fator de resposta da fórmula reconstituída.

$Rf_{st}$  é o fator de resposta da solução padrão.

O fator de resposta ( $Rf$ ) determina-se para cada solução através da equação 5.

$$RF = \frac{Abs_{obt}}{C_{teor}} \quad (5)$$

Onde:

$Abs_{obt}$  é a absorvância média obtida através das leituras da solução padrão no UV-Vis.

$C_{teor}$  é a concentração obtida pela pesagem efetuada (mg/mL).

As equações 3, 4 e 5 foram definidas de acordo com o procedimento operacional padrão interno de forma a cumprir os requisitos das autoridades reguladoras.

Os comprimentos de onda foram definidos para cada SA, em função das percentagens de interferência, sendo escolhido o que apresentava menores percentagens de interferência e valores de absorvância próximos de 1,0, com a exclusão dos comprimentos de onda correspondentes aos máximos ou mínimos de absorvância.

Na Tabela 5 encontram-se sumariados os resultados do parâmetro especificidade para cada SA no comprimento de onda definido do método.

**Tabela 5.** Resultados do parâmetro especificidade, interferências 1 e 2, para as substâncias ativas de classes BCS I, II, III e IV no comprimento de onda definido no método analítico de cada SA e avaliação do critério de aceitação para as interferências.

SA Classe BCS	Comprimento de Onda (nm)	Interferência 1 (%) CA ≤ 2 %	Interferência 2 (%) CA ≤ 2 %	Avaliação
I	235	0,42	0,99	CUMPRE
II	245	0,66	0,30	CUMPRE
III	265	0,16	0,25	CUMPRE
IV	239	0,26	0,43	CUMPRE

Com base nos resultados, o comprimento de onda selecionado para o método analítico da SA de classe BCS I, BCS II, BCS III e BCS IV foi 235 nm, 245 nm, 265 nm e 239 nm, respectivamente. Os resultados relativos às interferências 1 e 2 para cada método analítico e para os comprimentos de onda selecionados foram inferiores aos 2 % definidos como limite máximo, o que significa que os excipientes presentes na formulação inovadora não interferem na quantificação das substâncias ativas podendo-se por isso afirmar que todos os métodos analíticos são específicos para a substância ativa em análise.

#### 4.2.2.2. Precisão do Sistema

Os resultados da precisão do sistema obtidos a partir de seis leituras consecutivas de uma solução padrão de SA de classe BCS I, BCS II, BCS III e BCS IV na concentração de trabalho e comprimento de onda do método estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Resultados da precisão do sistema para as diferentes substâncias ativas, obtidas através de seis leituras da solução de SA na concentração de trabalho do método e avaliação do critério de aceitação para o RSD obtido.

Leitura (Abs)	SA Classe BCS			
	I	II	III	IV
1	1,2294	1,0263	0,9990	1,0090
2	1,2286	1,0294	0,9953	1,0081
3	1,2261	1,0358	1,0014	1,0119
4	1,2260	1,0314	0,9963	1,0090

<b>5</b>	1,2277	1,0370	0,9973	1,0091
<b>6</b>	1,2271	1,0452	0,9961	1,0107
<b>Média (Abs)</b> (n=6)	1,2275	1,0342	0,9976	1,0096
<b>RSD (%)</b> CA ≤ 2 %	0,11	0,65	0,23	0,14
<b>Avaliação</b>	CUMPRE	CUMPRE	CUMPRE	CUMPRE

O valor do RSD foi calculado através das absorvâncias adquiridas entre as seis medições efetuadas a partir da mesma solução e os resultados obtidos mostram que o sistema é preciso, ou seja, existe repetibilidade das leituras no sistema conferindo aos métodos analíticos respostas rigorosas e confiáveis.

#### 4.2.2.3. Linearidade

A linearidade dos métodos analíticos desenvolvidos foi demonstrada para uma gama de concentrações entre 60 % e 140 % da concentração de trabalho definida no ponto 4.2.1.2. Foram preparadas e analisadas cinco soluções com concentrações conhecidas e aproximadamente iguais a 60 %, 80 %, 100 %, 120 % e 140 % da concentração de trabalho. Cada uma das soluções foi lida em triplicado. Os resultados obtidos estão sumariados nas Tabelas 7, 8, 9 e 10, para as SA de classe BCS I, II, III e IV, respetivamente.

**Tabela 7.** Resultados da média das absorvâncias das soluções a diferentes níveis de concentração da SA de classe BCS I.

<b>Nível (%)</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Média (Abs) (n=3)</b>
60	0,024	0,7229
80	0,032	0,9551
100	0,040	1,2018
120	0,048	1,4295
140	0,056	1,6717

**Tabela 8.** Resultados da média das absorvâncias das soluções a diferentes níveis de concentração da SA classe de BCS II.

<b>Nível (%)</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Média (Abs) (n=3)</b>
60	0,012	0,6242
80	0,016	0,7869
100	0,020	1,0182
120	0,024	1,2388
140	0,028	1,4033

**Tabela 9.** Resultados da média das absorvâncias das soluções a diferentes níveis de concentração da SA de classe BCS III.

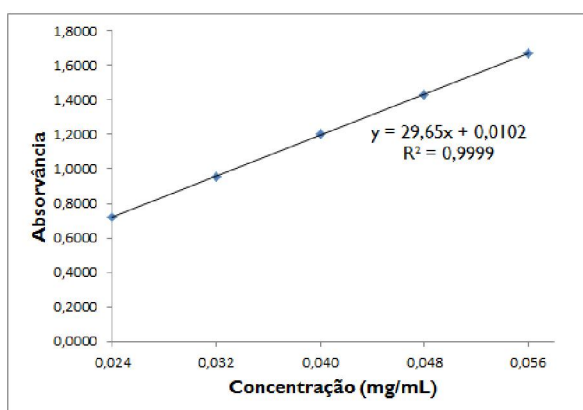
Nível (%)	Concentração (mg/mL)	Média (Abs) (n=3)
60	0,024	0,6050
84	0,034	0,8400
100	0,040	1,0109
119	0,048	1,2131
140	0,056	1,4003

**Tabela 10.** Resultados da média das absorvâncias das soluções a diferentes níveis de concentração da SA de classe BCS IV.

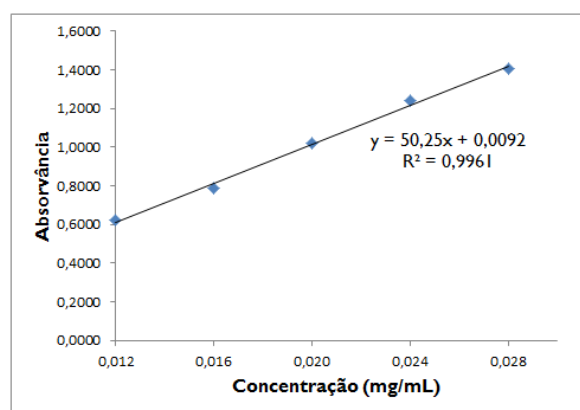
Nível (%)	Concentração (mg/mL)	Média (Abs) (n=3)
60	0,018	0,5974
80	0,024	0,7990
100	0,030	1,0033
120	0,036	1,1973
140	0,042	1,3799

É de realçar que os níveis de concentração estudados foram equidistantes entre si para garantir que os resultados obtidos são diretamente proporcionais.

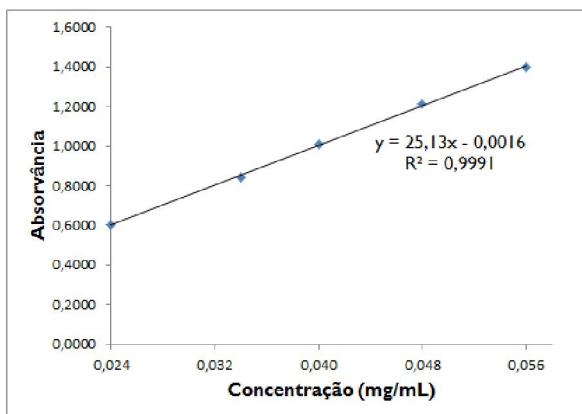
Os valores de absorvância e concentração sumariados nas Tabela 7, 8, 9 e 10 estão representados graficamente nas Figuras 21, 22, 23 e 24.



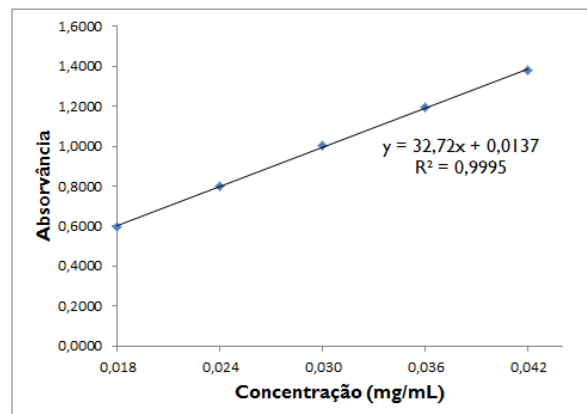
**Figura 21.** Curva de calibração da SA de classe BCS I.



**Figura 22.** Curva de calibração da SA de classe BCS II.



**Figura 23.** Curva de calibração da SA de classe BCS III.



**Figura 24.** Curva de calibração da SA de classe BCS IV.

Para cada uma das curvas de calibração obtidas foram calculados os parâmetros da regressão linear definidos para a linearidade: declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação ( $r$ ) e a soma dos resíduos quadrados. Os resultados de cada um destes parâmetros estão sumariados na Tabela II para a SA de classe BCS I, BCS II, BCS III e BCS IV.

A linearidade é avaliada tendo em conta a percentagem da ordenada na origem (percentagem do desvio de zero) relativamente à absorvância da solução a 100% através da equação 6, definida de acordo com o procedimento operacional padrão interno de forma a cumprir os requisitos das autoridades reguladoras.

$$\% \text{ Ordenada na Origem} = \frac{\text{Ord. Origem}}{\text{Abs}_{100\%}} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

Ord. Origem é a ordenada na origem obtida pelo método dos mínimos quadrados (regressão linear).

Abs<sub>100%</sub> é a absorvância média da solução a 100 %.



**Tabela II.** Resultados dos parâmetros da regressão linear: declive, ordenada na origem, soma dos resíduos quadrados, coeficiente de correlação, percentagem da ordenada na origem das SAs de classe BCS I, II, III e IV e avaliação de acordo com os critérios de aceitação dos parâmetros do coeficiente de correlação e percentagem da ordenada na origem.

<b>SA Classe BCS</b>	<b>Declive</b>	<b>Ordenada na Origem</b>	<b>Soma dos resíduos quadrados</b>	<b>Coeficiente de correlação (r)</b> CA $\geq$ 0,9970	<b>Ordenada na Origem (%)</b> CA $\leq$ 3 %
<b>I</b>	29,65	0,0102	6,42e-05	0,9999	0,85
<b>II</b>	50,25	0,0092	1,58e-03	0,9981	0,91
<b>III</b>	25,13	- 0,0016	3,30e-04	0,9996	- 0,15
<b>IV</b>	32,72	0,0137	1,89e-04	0,9998	1,37
<b>Avaliação</b>				CUMPRE	CUMPRE

Os resultados obtidos pelos parâmetros da equação da reta de regressão foram estabelecidos com base no método dos mínimos quadrados. Os valores correspondentes à percentagem da ordenada na origem exprimem o desvio relativamente ao eixo vertical (eixo dos y) e para todas as SA foi cumprido o critério de aceitação ( $\leq 3\%$ ), sendo a relação linear da reta tanto melhor quanto menor a percentagem da ordenada na origem.

O valor do coeficiente de correlação (r) exprime a relação linear entre os valores de absorvância e os valores de concentração e é expresso entre 0 e 1, o valor de 1 corresponde a uma relação linear perfeita. Atendendo aos resultados obtidos para as diferentes substâncias ativas foi cumprido o critério de aceitação ( $\geq 0,997$ ) relativo ao coeficiente de correlação.

O declive e a soma dos resíduos quadrados são parâmetros informativos, contudo, quanto menor a soma dos resíduos quadrados, melhor a relação linear do método.

Concluindo, os resultados obtidos para o parâmetro da linearidade mostram que os métodos analíticos são lineares para a gama de concentrações estudadas.

#### 4.2.2.4. Exatidão

O teste de exatidão foi avaliado através da leitura de três soluções de fórmula reconstituída preparadas a partir de pesagens independentes da substância ativa na concentração de trabalho (0,04 mg/mL) e dos excipientes (0,56 mg/mL), para a SA de classe BCS I e BCS III, da substância ativa na concentração de trabalho (0,02 mg/mL) e dos excipientes (0,28 mg/mL), para a SA de classe BCS II e da substância ativa na concentração de trabalho (0,03 mg/mL) e dos excipientes (0,42 mg/mL), para a SA de classe BCS IV.

Os resultados da exatidão para as amostras de substância ativa da classe BCS I, BCS II, BCS III e BCS IV foram calculados em termos de recuperação através da equação 7 e estão sumariados na Tabela 12.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{\text{obt}}}{C_{\text{teor}}} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

$C_{\text{obt}}$  é a concentração obtida através da leitura da amostra no UV-Vis (mg/mL).

$C_{\text{teor}}$  é a concentração efetivamente obtida pela pesagem efetuada (mg/mL).

A equação 7 foi definida de acordo com o procedimento operacional padrão interno de forma a cumprir os requisitos das autoridades reguladoras.

**Tabela 12.** Resultado do parâmetro exatidão para as amostras de SA de classe BCS I, II, III e IV, a partir dos valores de concentração teórica e concentração obtidos para determinar a recuperação das amostras, recuperação média, SD, RSD e intervalo de confiança a 95 % e avaliação de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para a recuperação e RSD.

SA Classe BCS	Conc. Teórica (mg/mL)	Conc. Obtida (mg/mL)	Recuperação (%) CA: 98 % -102 %	Recuperação Média (%) CA: 98 % -102 %	SD (%)	RSD (%) CA ≤ 2 %	IC 95 % (%)	
							Min.	Máx.
I	0,0404	0,0400	99,01	98,84	0,52	0,53	97,55	100,13
	0,0402	0,0399	99,25					
	0,0401	0,0394	98,25					

II	0,0200	0,0201	100,50	<b>100,50</b>	0,50	<b>0,50</b>	99,26	101,74
	0,0200	0,0200	100,00					
	0,0200	0,0202	101,00					
III	0,0398	0,0399	100,25	<b>100,00</b>	0,44	<b>0,44</b>	98,91	101,09
	0,0400	0,0401	100,25					
	0,0396	0,0394	99,49					
IV	0,0300	0,0302	100,67	<b>99,89</b>	0,84	<b>0,84</b>	97,80	101,98
	0,0300	0,0300	100,00					
	0,0300	0,0297	99,00					
<b>Avaliação</b>			CUMPRE	CUMPRE		CUMPRE		

As amostras foram avaliadas contra uma calibração constituída por duas soluções padrão das substâncias ativas na concentração de trabalho do método, para garantir a desempenho do sistema ao longo da análise das amostras. A concentração obtida para cada amostra foi calculada em função do valor de absorvância da leitura no espectrofotômetro UV-Vis, e da média dos fatores de resposta das soluções padrão através da equação 8, definida de acordo com o procedimento operacional padrão interno de forma a cumprir os requisitos das autoridades reguladoras.

$$C_{\text{obt}} = \frac{Abs_{\text{obt}}}{MRf} \quad (8)$$

Onde:

$Abs_{\text{obt}}$  é a absorvância obtida através das leituras da solução de RF no UV-Vis.

$MRf$  é a média dos fatores de resposta das soluções padrão.

Os valores da concentração obtida para cada SA estão representados nas Tabelas V, VI, VII e VIII em Anexo.

Os valores de recuperação e os valores de RSD obtidos para as diferentes substâncias ativas cumprem os critérios de aceitação estabelecidos pelas farmacopeias. O intervalo de confiança a 95 % permite estimar as recuperações das amostras para cada substância ativa.

Em suma, conclui-se que os métodos analíticos das SA de classe BCS I, BCS II, BCS III e BCS IV quantificam de forma rigorosa e exata as substâncias ativas no nível da concentração de trabalho.

Concluindo, os parâmetros de validação cumprem os critérios de aceitação das farmacopeias, e deste modo, os métodos analíticos das SA de classe BCS I, BCS II, BCS III e BCS IV mostram que são adequados ao seu propósito, ou seja, a quantificação das substâncias ativas.

#### 4.3. Condições dos Métodos para as Substâncias Ativas de Classe BCS I, II, III e IV

As condições dos métodos analíticos como o solvente, concentração de trabalho, detecção, células, temperatura e equipamento usados para cada substância ativa encontram-se resumidos na Tabela 13.

**Tabela 13.** Condições dos métodos analíticos: solvente, concentração de trabalho, detecção, células, temperatura e equipamento usados para as substâncias ativas de classe BCS I, II, III e IV.

Condições	Substância Ativa			
	Classe BCS I	Classe BCS II	Classe BCS III	Classe BCS IV
Solvente:	ACN : H <sub>2</sub> O u.p. (30:70, v/v)	ACN : H <sub>2</sub> O u.p. (50:50, v/v)	HCl 0,1 N : CH <sub>3</sub> OH (50:50, v/v)	CH <sub>3</sub> OH : H <sub>2</sub> O u.p. (50:50, v/v)
Concentração de trabalho:	0,04 mg/mL	0,02 mg/mL	0,04 mg/mL	0,03 mg/mL
Deteção:	235 nm	245 nm	265 nm	239 nm
Células:	1 cm			
Temperatura:	Ambiente (20 - 23°C)			
Equipamento:	Espectrofotômetro UV-Vis de Duplo Feixe			

## 5. Estratégias para o Incremento da Solubilidade de Substâncias Ativas

A grande maioria das moléculas utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos apresenta baixa solubilidade em água e consequentemente uma fraca absorção após administração oral. Um dos desafios da indústria farmacêutica consiste em desenvolver formulações inovadoras que permitam melhorar a sua solubilidade e como tal, melhorar a sua biodisponibilidade.

Neste capítulo serão apresentadas as várias estratégias utilizadas para aumentar a solubilidade de substâncias ativas pertencentes a diferentes classes biofarmacêuticas, passando pelo uso de co-solventes, ciclodextrinas e/ou surfactantes. A avaliação da solubilidade das diferentes classes de moléculas foi feita recorrendo aos métodos analíticos desenvolvidos e apresentados no capítulo 4.

### 5.1. Experimental

#### 5.1.1. Materiais

Neste trabalho foram utilizadas 4 substâncias ativas de diferentes classes biofarmacêuticas: substância ativa de classe BCS I, BCS II, BCS III e BCS IV adquiridas a diferentes fornecedores.

Os co-solventes (Etanol absoluto e PEG 400), ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) e surfactantes (SLS, Tween 80, PEG 6000 e Kolliphor P407 Micro) foram adquiridos a diferentes fornecedores.

Os reagentes usados foram o metanol adquirido à Merck, o acetonitrilo à VWR, o ácido clorídrico 37 % à VWR, a água ultrapura foi obtida internamente através do sistema de purificação Milli-Q® Advantage A10 e a água purificada foi obtida internamente.

#### 5.1.2. Equipamentos

A nível de equipamento recorreu-se a instrumentação analítica qualificada e calibrada de acordo com os requisitos das entidades reguladoras, nomeadamente, balança analítica (Mettler Toledo, XS205DU), microbalança (Sartorius, MSA6.6S), ultrassons (Bandelin,

Sonorex Super), centrífuga (VWR, himac CT6E) e espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe (Analytik Jenna, Specord 210 Plus) com o suporte lógico WinASPECT® PLUS.

### 5.1.3. Protocolo de Solubilidade

O protocolo para determinar a solubilidade das substâncias ativas consiste na preparação de 10 mL de soluções aquosas ou hidroalcoólicas com posterior adição da substância ativa em excesso.

De seguida as amostras são colocadas em agitação e avalia-se visualmente a saturação da solução. Entenda-se que uma solução saturada apresenta um aspeto opaco e/ou com partículas em suspensão. Caso se verifique que a solução está transparente/límpida continua-se a adição da substância ativa até que esta atinja a saturação.

Depois de saturadas as soluções são transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas a 4000 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos. Caso não se obtenha um sobrenadante transparente nestas condições, as amostras devem ser centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos.

Após centrifugação, o sobrenadante é diluído para a concentração de trabalho definida no método, tendo em conta a concentração teórica de SA, isto é, a quantidade de SA adicionada aos 10 mL de solução. Posteriormente, as amostras são quantificadas contra uma calibração preparada através de duas soluções padrão da SA na concentração de trabalho, tal como descrito em (4.2.2.4.).

O protocolo para determinar a solubilidade está esquematizado na Figura 25.



**Figura 25.** Diagrama esquemático do protocolo de solubilidade.

## 5.2. Resultados e Discussão

Neste capítulo encontram-se descritos os resultados do estudo de solubilidade para as substâncias ativas pertencentes a diferentes classes biofarmacêuticas (classe BCS I, II, III e IV).

De salientar, que para cada substância ativa foram previamente definidas solubilidades alvo. Estas são determinadas tendo em conta a dosagem do produto de referência, a biodisponibilidade esperada (ou referenciada na literatura) e o número de doses possível de administrar de acordo com a forma farmacêutica selecionada. Deste modo, a solubilidade alvo foi identificada para um intervalo em que o valor máximo corresponde à dosagem ideal e o valor mínimo à dosagem mínima necessária para o uso destes fármacos ser exequível na forma farmacêutica que está a ser desenvolvida. Importante referir, que na forma farmacêutica em desenvolvimento, quanto mais próxima a solubilidade obtida estiver do limite máximo ideal, mais garantias vão existir em termos da exequibilidade técnica do produto. Neste sentido, foi necessário explorar diferentes estratégias para aumentar a solubilidade das substâncias ativas, nomeadamente, o uso de co-solventes, surfactantes ou ciclodextrinas na composição da formulação.

As solubilidades, expressas em miligramas por mililitro, foram obtidas para cada SA através dos valores de absorvância obtidos pela leitura das amostras por espectroscopia UV-Vis, tendo em conta as condições definidas para cada método analítico. De realçar que a percentagem de solubilizantes (co-solventes, surfactantes e ciclodextrinas) usada nas soluções foi avaliada para garantir que estes compostos não interferiam com a quantificação das substâncias ativas por espectroscopia UV-Vis.

Em seguida apresentam-se os resultados das solubilidades obtidas para as moléculas de classe BCS I, II, III e IV.

### 5.2.1. Substância Ativa Classe BCS I

As substâncias ativas pertencentes à classe BCS I apresentam elevada solubilidade e permeabilidade, logo, nestes casos a solubilidade em solução aquosa, de um modo geral não é limitante para novas formas farmacêuticas.

Esta molécula apresenta uma solubilidade teórica em solução aquosa igual a 69 mg/mL, deste modo, e em virtude do intervalo da solubilidade alvo ser entre 7 mg/mL e 29 mg/mL para a substância ativa de classe BCS I, a estratégia passou por adicionar a quantidade necessária de SA para obter a solubilidade alvo máxima e quantificar através do método analítico por espectroscopia UV-Vis essa solubilidade.

Os resultados da solubilidade em solução aquosa da SA de classe BCS I estão apresentados na Tabela 14 e os dados para estabelecer a solubilidade encontram-se na Tabela IX em Anexo.

**Tabela 14.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS I em solução aquosa.

Solução	Solubilidade (mg/mL)
H <sub>2</sub> O	31,30

O resultado obtido para a solubilidade da substância ativa de classe BCS I (31,30 mg/mL) apresentado na Tabela 14 confirmou a elevada solubilidade em solução aquosa, e tal como o esperado não foi necessário aplicar nenhuma estratégia para aumentar a solubilidade da molécula.

O facto da substância ativa de classe BCS I apresentar a solubilidade alvo máxima, significa que esta molécula poderá ser usada num protótipo da forma farmacêutica em desenvolvimento.

#### 5.2.2. Substância Ativa Classe BCS II

Uma substância ativa pertencente à classe BCS II apresenta baixa solubilidade e elevada permeabilidade, deste modo é expectável que esta molécula apresente uma baixa solubilidade quando incorporada na formulação farmacêutica em desenvolvimento. Para verificar a exequibilidade em integrar uma molécula desta classe na formulação em questão, foi selecionada uma substância ativa cuja solubilidade teórica em água é igual a 0,117 mg/mL e cujo intervalo da concentração alvo pretendida é entre 7 mg/mL e 29 mg/mL.



Numa primeira abordagem foi efetuado um estudo de solubilidade da molécula em água, mostrando um máximo de concentração igual a 0,0045 mg/mL (Tabela 15), sendo este valor muito inferior à solubilidade teórica da molécula. Os dados que permitiram estabelecer a solubilidade encontram-se na Tabela X em Anexo.

**Tabela 15.** Resultados da solubilidade em solução aquosa da SA de classe BCS II.

Solução	Solubilidade (mg/mL)
H <sub>2</sub> O	0,0045

Com o objetivo de aumentar a solubilidade desta molécula, a primeira estratégia passou pelo uso de uma solução hidroalcoólica (H<sub>2</sub>O:EtOH) numa proporção (1,7:1,0), tendo sido esta proporção também definida como estratégia a utilizar na formulação em desenvolvimento. O etanol absoluto é comumente usado como co-solvente para auxiliar a formação de complexos de inclusão e, conseqüentemente, aumentar a solubilidade da molécula em solução. Os resultados da solubilidade da SA de classe BCS II nesta solução estão representados na Tabela 16 e os dados para estabelecer esta solubilidade encontram-se na Tabela XI em Anexo.

**Tabela 16.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS II em solução hidroalcoólica.

Solução	Solubilidade (mg/mL)
H <sub>2</sub> O:EtOH (1,7:1,0)	0,1556

Os dados mostram que a solubilidade da molécula de classe BCS II em solução hidroalcoólica é de 0,1556 mg/mL, correspondendo a um aumento de 34 vezes relativamente à sua solubilidade em solução aquosa. Apesar do aumento observado com a utilização deste co-solvente, este resultado está ainda longe da solubilidade alvo mínima pretendida de 7 mg/mL. Deste modo, numa segunda abordagem foi testado o impacto do uso de diferentes concentrações de ciclodextrinas na solubilidade da substância ativa (Tabela 17), através da realização de um estudo de solubilidade de fase. Os dados que permitiram determinar as solubilidades encontram-se na Tabela XII em Anexo.

**Tabela 17.** Resultado do estudo de solubilidade de fase para a SA de classe BCS II em solução aquosa com diferentes percentagens de ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD).

Solução			Solubilidade (mg/mL)
H <sub>2</sub> O	HP- $\beta$ -CD (%)	Concentração HP- $\beta$ -CD (mg/mL)	
	0	0	0,0045
	1,4	14,0	0,0683
	7,0	70,0	0,3062
	14	140	0,6470
	35	350	1,6163
	71	710	2,7355

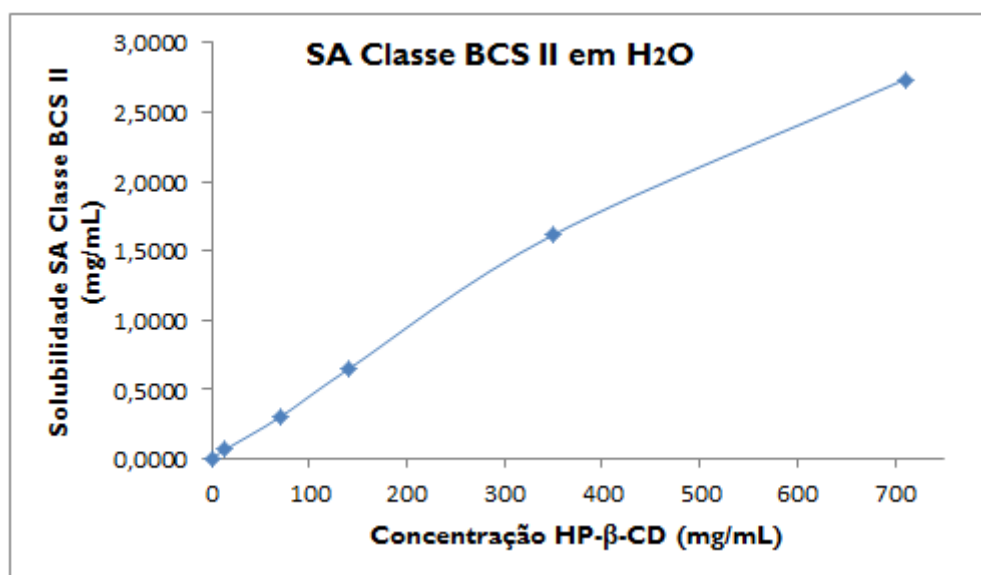
Os resultados do estudo de solubilidade de fase mostram que quanto maior a percentagem de ciclodextrinas utilizada, maior a solubilidade da molécula em solução aquosa (Tabela 17 e Figura 26). Este comportamento deve-se ao facto das ciclodextrinas agregarem no seu interior a substância ativa, e formarem um equilíbrio entre forma livre e forma complexada permitindo um aumento da solubilidade da molécula complexada.

No entanto, a análise do perfil de solubilidade da substância ativa de classe BCS II (Figura 26) mostra que a molécula apresenta uma relação praticamente direta entre a solubilidade e a concentração de ciclodextrinas até cerca de 300 mg/mL, e que a partir dessa concentração existe uma tendência de abrandamento da solubilidade. Neste estudo, o resultado mais promissor foi obtido para uma concentração de HP- $\beta$ -CD igual a 71% (710 mg/mL), obtendo-se um aumento da solubilidade da substância ativa de 0,0045 mg/mL para 2,7355 mg/mL.

De referir que, apesar do aumento da solubilidade com o aumento da percentagem de ciclodextrinas, a utilização de elevadas quantidades de ciclodextrinas em solução aquosa, pode ser uma desvantagem para formas farmacêuticas orais líquidas, na medida em que estas moléculas têm a capacidade de alterar a viscosidade das soluções. É

importante uma forma farmacêutica oral líquida apresentar um grau de viscosidade adequado, dado que esta condição pode melhorar o sabor das preparações líquidas. Adicionalmente, uma formulação com elevada viscosidade poderá ter impacto na dissolução dos restantes componentes da formulação, e portanto comprometer a viabilidade do produto final [45]. Por outro lado, segundo a lista de ingredientes inativos da FDA [32], a dose máxima de HP- $\beta$ -CD definida para formas orais em solução é 400 mg/mL por unidade de dose, deste modo, a toxicidade das ciclodextrinas é também um fator a ter em consideração na formulação em desenvolvimento. Outro fator importante a ter em consideração, relaciona-se com o custo/benefício do uso de ciclodextrinas em produtos medicamentosos, uma vez que estas moléculas apresentam custos bastante elevados, podendo inviabilizar um produto farmacêutico.

Apesar do aumento de solubilidade obtido pelo uso de ciclodextrinas, não foi possível atingir a concentração alvo pretendida (7 mg/mL - 29 mg/mL). No entanto e de acordo com a classificação de solubilidade (Tabela I) esta molécula passou de praticamente insolúvel para pouco solúvel em solução aquosa. Como trabalho futuro, a estratégia para atingir a solubilidade alvo poderá passar pelo uso, por exemplo de surfactantes.



**Figura 26.** Perfil de solubilidade da SA de classe BCS II.

### 5.2.3. Substância Ativa Classe BCS III

As substâncias ativas pertencentes à classe BCS III apresentam elevada solubilidade e baixa permeabilidade, e tal como as moléculas de classe BCS I é expectável que estas apresentem elevada solubilidade em solução aquosa.

A solubilidade teórica da substância ativa de classe BCS III escolhida é igual a 25 mg/mL, contudo o intervalo da solubilidade alvo para esta molécula é entre 17 mg/mL e 71 mg/mL. A solubilidade alvo mínima para a SA de classe BCS III é 17 mg/mL, por isso e tendo em conta a solubilidade teórica, é esperado atingir-se esta solubilidade para a molécula em estudo. Neste sentido, realizou-se um estudo de solubilidade para determinar a solubilidade real da molécula em solução aquosa, através de um método analítico rigoroso e adequado por espectroscopia UV-Vis. Os resultados deste estudo encontram-se apresentados na Tabela 18 e os dados para estabelecer a solubilidade encontram-se na Tabela XIII em Anexo.

**Tabela 18.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução aquosa.

Solução	Solubilidade (mg/mL)
H <sub>2</sub> O	26,57

Os resultados mostram que a solubilidade da substância ativa de classe BCS III em solução aquosa é 26,57 mg/mL, valor próximo da solubilidade teórica desta molécula (25 mg/mL), sendo classificada como ligeiramente solúvel em solução aquosa (de acordo com a Tabela I). Apesar da solubilidade alvo mínima ter sido atingida, a solubilidade alvo máxima desta molécula é de 71 mg/mL, desta maneira, foram realizados estudos de solubilidade em solução aquosa com diferentes surfactantes (Lauril sulfato de sódio (SLS), Tween 80, Kolliphor P407 Micro e Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000)). A percentagem usada para cada um dos surfactantes está listada na Tabela 19, e foi selecionada com base na informação listada na base de dados de ingredientes inativos da FDA [32]. Os resultados desse estudo encontram-se sumariados na seguinte Tabela.

**Tabela 19.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução aquosa com diferentes surfactantes.

Solução		Solubilidade (mg/mL)
H <sub>2</sub> O	Surfactante (%)	
	SLS 0,259 %	0,28
	Tween 80 0,50 %	26,38
	Kolliphor P407 Micro 0,90 %	28,89
	PEG 6000 5,83 %	25,46

Os resultados permitem concluir que o uso de 0,90 % de Kolliphor P407 Micro aumentou a solubilidade da molécula em solução aquosa, dado que foi obtida uma solubilidade de 28,89 mg/mL, superior à obtida para a SA de classe BCS III em solução aquosa (26,57 mg/mL). Para as soluções aquosas com 0,5% de Tween 80 e 5,83 % de PEG 6000, a solubilidade obtida foi ligeiramente inferior à solubilidade em solução aquosa sem surfactantes, este facto pode ser explicado devido à elevada polaridade da substância ativa de classe BCS III. Segundo a literatura o impacto dos surfactantes na solubilização da molécula é significativo apenas quando a substância ativa é apolar e, deste modo, consegue apresentar alta afinidade com o interior da micela [18]. Igualmente, para a solução aquosa com 0,259 % de SLS a solubilidade obtida foi muito inferior à solubilidade aquosa, o que leva a crer que este surfactante em contacto com a molécula de classe BCS III não é eficaz devido à elevada polaridade da substância ativa. Para além disso, de acordo com a literatura os surfactantes não iónicos, como o Tween 80, PEG 6000 e Kolliphor P40 Micro, geralmente, apresentam valores de CMC inferiores aos surfactantes iónicos [18]. Assim, os surfactantes não iónicos promovem uma solubilização mais eficiente da molécula no interior da micela.

A razão pela qual a solubilidade da SA de classe BCS III com o surfactante SLS ter sido tão baixa, pode dever-se ao facto deste ser classificado como um surfactante aniónico e, consequentemente, a sua capacidade de solubilização do composto ter sido inferior, quando comparada com os restantes surfactantes (não iónicos).

Em virtude dos resultados obtidos foi aplicado o uso de co-solventes - etanol absoluto e Polietilenoglicol 400 (PEG 400) - numa tentativa de aumentar a solubilidade desta molécula. De acordo com a literatura, os co-solventes são utilizados como estratégia para aumentar a solubilidade de moléculas, uma vez que estes vão diminuir a polaridade da solução aquosa e, neste sentido, fazem com que a polaridade da solução seja semelhante à polaridade da substância ativa em solução [18].

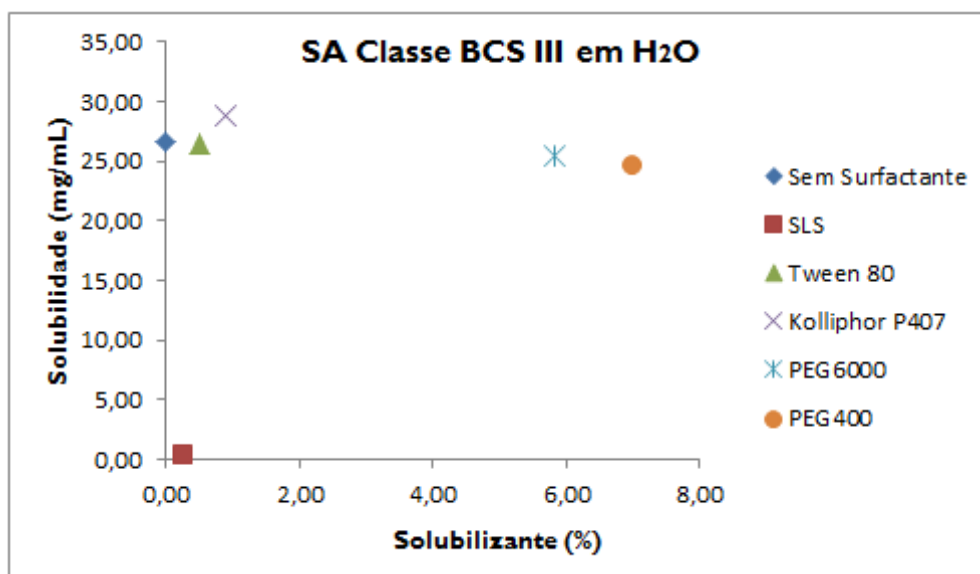
Na Tabela 20 apresentam-se os resultados da solubilidade da SA de classe BCS III utilizando estes dois co-solventes, e os dados para estabelecer as solubilidades encontram-se na Tabela XV em Anexo.

**Tabela 20.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução hidroalcoólica e solução aquosa com co-solvente (PEG 400).

Solução		Solubilidade (mg/mL)
H <sub>2</sub> O:EtOH (1,7:1,0)	Co-solvente (%)	
	EtOH	10,04
H <sub>2</sub> O	PEG 400 7,0 %	24,65

Os resultados mostram que a solubilidade obtida para a SA de classe BCS III em solução hidroalcoólica (10,03 mg/mL) é inferior à solubilidade em solução aquosa (26,57 mg/mL), tal como a solubilidade obtida com o uso do co-solvente PEG 400 (24,65 mg/mL). Estes resultados podem dever-se ao facto da substância ativa de classe BCS III apresentar grupos polares que lhe conferem algum grau de polaridade, e como descrito na literatura, nos casos em que a substância ativa apresenta elevada polaridade, a estratégia do uso de co-solventes não é eficiente, visto que a vantagem de solubilização é reduzida [18].

Na Figura 27 apresentam-se os resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução aquosa, solução aquosa com surfactantes e o co-solvente (PEG 400), (os dados que permitiram estabelecer as solubilidades encontram-se em anexo na Tabela XIV).



**Figura 27.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução aquosa.

Os resultados obtidos para a solubilidade da substância ativa de classe BCS III mostram que apenas a utilização de 0,90 % do surfactante Kolliphor P407 Micro aumentou a solubilidade da SA de classe BCS III. A solubilidade da molécula com os surfactantes Tween 80 (26,38 mg /mL) e PEG 6000 (25,46 mg/mL), assim como com o co-solvente PEG 400 (24,65 mg/mL) foi relativamente inferior à solubilidade da molécula em solução aquosa. Por último, a solubilidade obtida com o uso do surfactante SLS (0,28 mg/mL) foi muito inferior à solubilidade em solução aquosa.

Atendendo aos resultados obtidos, a solubilidade alvo de 71 mg/mL ficou longe de ser atingida, e optou-se por testar a combinação dos co-solventes etanol e/ou PEG 400 com surfactantes. Os resultados desta combinação encontram-se sumariados na Tabela 21.

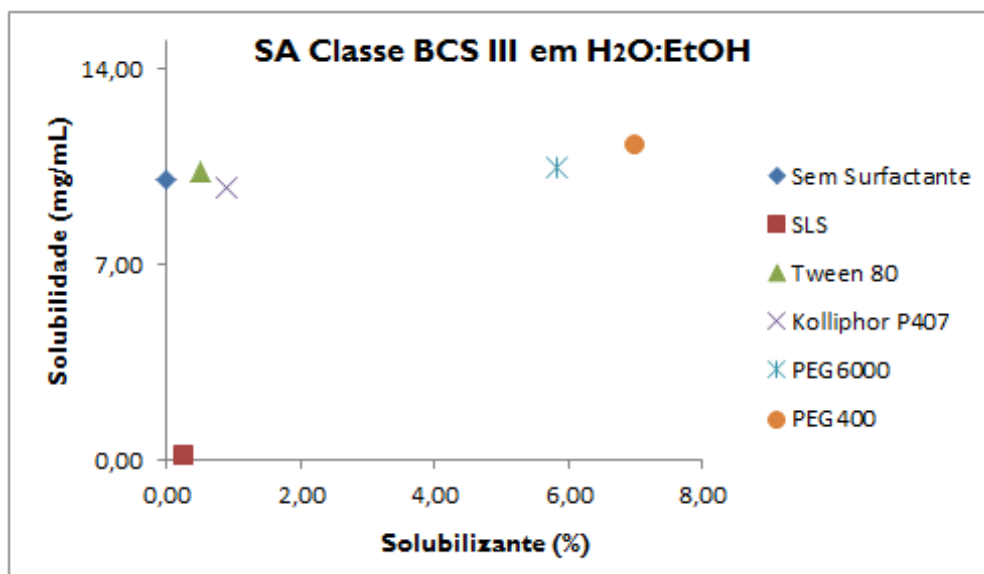
**Tabela 21.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução hidroalcoólica com surfactantes e o co-solvente PEG 400.

Solução		Solubilidade (mg/mL)
	Surfactante / Co-solvente (%)	
H <sub>2</sub> O:EtOH (1,7:1,0)	SLS 0,259 %	0,15
	Tween 80 0,50 %	10,34
	Kolliphor P407 Micro 0,90 %	9,72
	PEG 6000 5,83 %	10,50
	PEG 400 7,0 %	11,25

Da análise dos resultados da Tabela 21 é possível concluir que os valores de solubilidade da SA de classe BCS III obtidos são bastante inferiores aos resultados de solubilidade em solução aquosa, e solução aquosa com a mesma quantidade de surfactante ou co-solvente. Estes resultados evidenciam que o uso de co-solventes e/ou surfactantes não são vantajosos para o aumento de solubilidade da molécula muito provavelmente devido às características polares que esta molécula apresenta.

Na Figura 28 estão representados os resultados da solubilidade da substância ativa de classe BCS III em solução hidroalcoólica, solução hidroalcoólica com surfactantes e solução hidroalcoólica com o co-solvente PEG 400. Na Tabela XV, em anexo, apresentam-se os dados que permitiram estabelecer estas solubilidades.





**Figura 28.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS III em solução hidroalcoólica.

Os resultados obtidos para a substância ativa de classe BCS III mostram que o uso da combinação do co-solvente etanol com os surfactantes Tween 80 (10,34 mg /mL), Kolliphor P407 Micro (9,72 mg/mL) e PEG 6000 (10,50 mg/mL) não resultou no aumento da solubilidade da molécula, mantendo-se os valores de solubilidade idênticos à solubilidade em solução hidroalcoólica (10,04 mg/mL). De realçar que a molécula apresentou uma solubilidade semelhante em solução hidroalcoólica com 0,259 % de SLS (0,15 mg/mL) e em solução aquosa com o mesmo surfactante (0,28 mg/mL), correspondendo estas condições aos valores mais baixos de solubilidade. Por último, a solubilidade obtida com a combinação de co-solventes, etanol e PEG 400, (11,25 mg/mL) também foi semelhante à solubilidade da molécula em solução hidroalcoólica (10,04 mg/mL).

As estratégias aplicadas à substância ativa de classe BCS III não resultaram, numa tentativa de atingir a solubilidade alvo máxima de 71 mg/mL. Contudo, este estudo permitiu determinar rigorosamente a solubilidade desta substância com a aplicação de diferentes estratégias, e evidenciou também o impacto que as propriedades físico-químicas dos compostos (substância ativa e solubilizantes) podem ter na eficácia das estratégias usadas para aumentar a solubilidade de moléculas com elevada polaridade.

#### 5.2.4. Substância Ativa Classe BCS IV

As substâncias ativas pertencentes à classe BCS IV apresentam baixa solubilidade e permeabilidade, e tal como as moléculas de classe BCS II é expectável que estas apresentem baixa solubilidade em solução aquosa.

A solubilidade teórica da substância ativa de classe BCS IV é cerca de 0,12 mg/mL, contudo o intervalo da solubilidade alvo desta molécula é entre 35 mg/mL e 141 mg/mL. Neste sentido realizou-se um estudo de solubilidade a fim de determinar o seu máximo de solubilidade em solução aquosa (Tabela 22). Em anexo (Tabela XVI) encontram-se os dados para estabelecer a solubilidade aquosa da SA de classe BCS IV.

**Tabela 22.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução aquosa.

Solução	Solubilidade (mg/mL)
H <sub>2</sub> O	0,1372

Como expectável, este estudo mostrou que a solubilidade da SA de classe BCS IV é 0,1372 mg/mL, semelhante à solubilidade teórica (0,1200 mg/mL), comprovando a sua baixa solubilidade em solução aquosa. Com estas características esta molécula é classificada como pouco solúvel em solução aquosa (de acordo com a informação da Tabela I).

De forma a atingir a concentração alvo desta molécula foram realizados estudos de solubilidade em solução aquosa com diferentes surfactantes (Lauril sulfato de sódio (SLS), Tween 80, Kolliphor P407 Micro e Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000)), utilizados na percentagem máxima possível de acordo com a lista de ingredientes inativos da FDA [32]. A estratégia do uso de surfactantes, na tentativa de aumentar a solubilidade da substância ativa de classe BCS IV foi utilizada e os resultados desse estudo encontram-se sumariados na Tabela 23 e em anexo (Tabela XVII).

**Tabela 23.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução aquosa com diferentes surfactantes.

Solução		Solubilidade (mg/mL)
H <sub>2</sub> O	Surfactante (%)	
	SLS 0,259 %	0,1747
	Tween 80 0,50 %	0,4396
	Kolliphor P407 Micro 0,90 %	0,1611
	PEG 6000 5,83 %	0,2942

Os resultados da Tabela 23 mostram que houve um incremento na solubilidade da substância ativa de classe BCS IV com o uso de surfactantes. O uso dos surfactantes SLS (0,1747 mg/mL), Kolliphor P407 Micro (0,1611 mg/mL) e PEG 6000 (0,2942 mg/mL) provocou um aumento ligeiro da solubilidade da molécula relativamente à sua solubilidade em solução aquosa (0,1372 mg/mL). O surfactante para o qual se obteve a maior solubilidade da molécula de classe BCS IV em solução aquosa foi o Tween 80 a 0,50 % (0,4396 mg/mL), com um aumento de 3 vezes relativamente à solubilidade da SA de classe BCS IV em solução aquosa (0,1372 mg/mL).

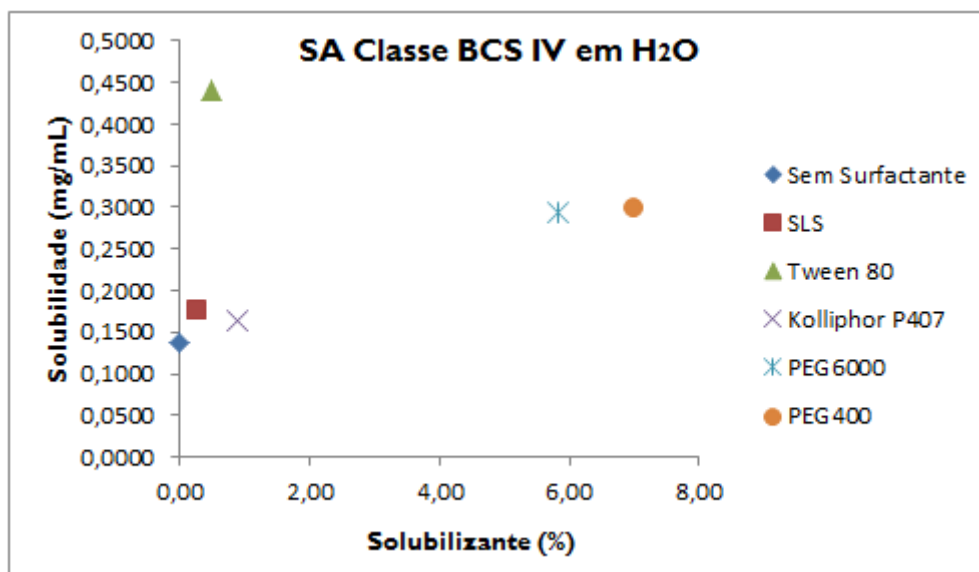
Atendendo aos resultados obtidos para esta molécula conclui-se que este composto continua a ser muito pouco solúvel em solução aquosa, e por isso, foi utilizada a estratégia do uso de co-solventes, etanol absoluto e PEG 400 com o intuito de aumentar a solubilidade da substância ativa de classe BCS IV. Os resultados relativos ao estudo da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica e em solução com o co-solvente PEG 400 encontram-se tabelados na Tabela 24 e os dados para determinar as solubilidades estão anexados na Tabela XVIII.

**Tabela 24.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica e solução aquosa com co-solvente (PEG 400).

Solução		Solubilidade (mg/mL)
	Co-solvente (%)	
H <sub>2</sub> O:EtOH (1,7:1,0)	EtOH	3,1080
H <sub>2</sub> O	PEG 400 7,0 %	0,2975

Os resultados mostram que a solubilidade da substância ativa de classe BCS IV aumentou em solução hidroalcoólica, com o uso de co-solvente (etanol absoluto), dado que se obteve uma solubilidade da SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica de 3,1080 mg/mL, correspondendo a um aumento de 22 vezes em relação à solubilidade da molécula em solução aquosa (0,1372 mg/mL). A solubilidade da SA de classe BCS IV melhorou ligeiramente com o uso do co-solvente PEG 400 em solução aquosa, obtendo-se uma solubilidade de 0,2975 mg/mL.

Os resultados da solubilidade da substância ativa de classe BCS IV em solução aquosa, solução aquosa com surfactantes e solução aquosa com o cosolvente PEG 400 estão representados na Figura 29.



**Figura 29.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução aquosa.

Os resultados obtidos para a solubilidade aquosa da substância ativa de classe BCS IV mostram que relativamente à solubilidade aquosa (0,1372 mg/mL), os surfactantes SLS (0,1747 mg/mL), Kolliphor P407 Micro (0,1640 mg/mL) e PEG 6000 (0,2941 mg/mL) e Tween 80 (0,4396 mg/mL) produzem um incremento na solubilidade da molécula de classe BCS IV, bem como o uso do co-solvente PEG 400 (0,2975 mg/mL).

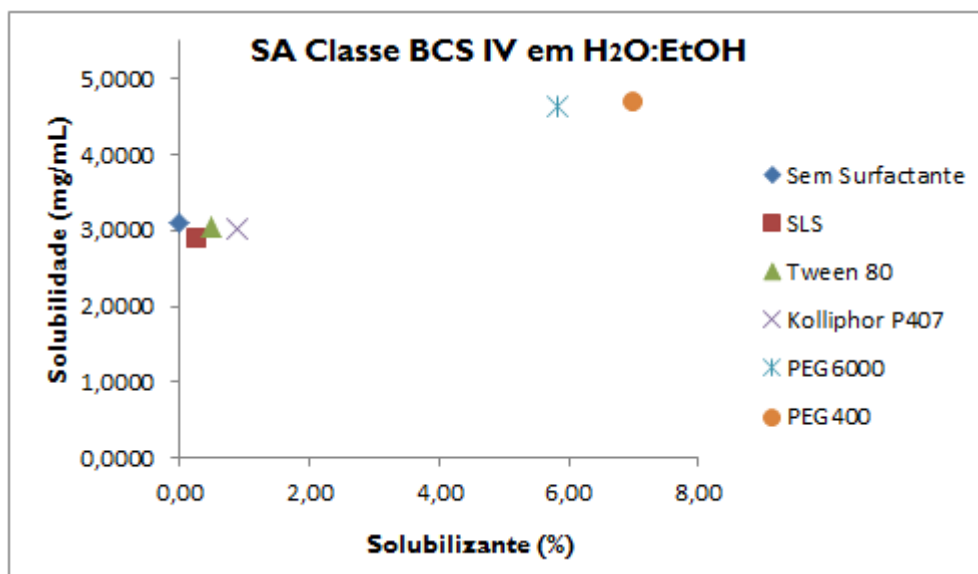
Atendendo aos resultados obtidos relativos à solubilidade da SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica (3,1080 mg/mL), e ao facto da solubilidade máxima conseguida para a molécula ainda estar longe do intervalo da solubilidade alvo (35 mg/mL - 141 mg/mL), optou-se por testar a combinação dos co-solventes etanol e/ou PEG 400 com surfactantes. Os resultados da solubilidade da molécula de classe BCS IV em solução hidroalcoólica com surfactantes e o co-solvente PEG 400 apresentam-se na Tabela 25 e nas Tabelas XIX e XX em Anexo.

**Tabela 25.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica com surfactantes e o co-solvente PEG 400.

Solução		Solubilidade (mg/mL)
	Surfactante / Co-solvente (%)	
H <sub>2</sub> O:EtOH (1,7:1,0)	SLS 0,259 %	2,8801
	Tween 80 0,50 %	3,0529
	Kolliphor P407 Micro 0,90 %	3,0248
	PEG 6000 5,83 %	4,6456
	PEG 400 7,0 %	4,6764

Dos resultados obtidos conclui-se que a solubilidade da SA de classe BCS IV mais elevada foi de 4,6764 mg/mL para 7,0 % de PEG 400 em solução hidroalcoólica, obtendo-se uma solubilidade 34 vezes superior relativamente à solubilidade em solução aquosa (0,1372 mg/mL). De salientar que a solubilidade obtida para 5,83 % de PEG 6000 foi 4,6456 mg/mL, 33 vezes superior à solubilidade da molécula em solução aquosa (0,1372 mg/mL), sendo esta idêntica à conseguida para o PEG 400.

A Figura 30 mostra os resultados obtidos para a solubilidade da substância ativa de classe IV em solução hidroalcoólica, solução hidroalcoólica com surfactantes e solução hidroalcoólica com o co-solvente PEG 400.



**Figura 30.** Resultados da solubilidade da SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica.

Da análise da Figura 30 pode concluir-se que o uso da combinação do co-solvente etanol com os surfactantes SLS (2,8801 mg/mL), Tween 80 (3,0529 mg /mL), Kolliphor P407 Micro (3,0248 mg/mL) e PEG 6000 (4,6456 mg/mL) foi uma estratégia eficiente para o aumento da solubilidade da molécula. Do mesmo modo que a solubilidade obtida com a combinação de co-solventes, etanol e PEG 400, (4,6764 mg/mL) foi uma estratégia que resultou no aumento da solubilidade da SA de classe BCS IV. Apesar dos resultados obtidos, foi conseguido um aumento de solubilidade de 34 vezes relativamente à solubilidade da molécula em solução aquosa. Ainda assim, a SA de classe BCS IV continua a ser classificada como pouco solúvel segundo a classificação de solubilidade da Tabela I apresentada no ponto (2.4.).

Na Tabela 26 estão sumariadas as solubilidades obtidas para cada substância ativa em solução aquosa; as estratégias que permitiram obter a máxima solubilidade para cada substância ativa; bem como a solubilidade máxima obtida e o intervalo da solubilidade alvo para cada molécula.

**Tabela 26.** Quadro resumo com a solubilidade obtida em solução aquosa, a(s) estratégia(s) usada(s) para obter a solubilidade máxima para as diferentes substâncias ativas e o intervalo da solubilidade alvo.

<b>Substância Ativa</b>	<b>Solubilidade em Solução Aquosa (mg/mL)</b>	<b>Estratégia</b>	<b>Solubilidade Obtida (mg/mL)</b>	<b>Intervalo da Solubilidade Alvo (mg/mL)</b>
<b>Classe BCS I</b>	> 31,30	Nenhuma	31,30	7 - 29
<b>Classe BCS II</b>	0,0045	Ciclodextrinas	2,74	7 - 29
<b>Classe BCS III</b>	26,57	Surfactante	28,89	17 - 71
<b>Classe BCS IV</b>	0,14	Combinação de co-solventes	4,67	35 - 141



## 6. Conclusões

No presente trabalho um dos objetivos consistia no desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de substâncias ativas presentes numa formulação inovadora. Este objetivo foi cumprido e a validação dos métodos analíticos demonstrou a adequabilidade destes para a quantificação de quatro substâncias ativas, pertencentes a diferentes classes biofarmacêuticas.

O estudo de estratégias para aumentar a solubilidade de substâncias ativas pouco solúveis, nomeadamente, substâncias ativas da classe BCS II e BCS IV, são de grande importância, já que, atualmente, a grande maioria das moléculas em desenvolvimento pertencem a estas classes biofarmacêuticas.

Este trabalho permitiu demonstrar que as estratégias do uso de co-solventes, ciclodextrinas e/ou surfactantes, bem como a sua combinação podem melhorar efetivamente a solubilidade das substâncias ativas pouco solúveis em solução aquosa.

O uso de ciclodextrinas (nomeadamente a HP- $\beta$ -CD) aumentou a solubilidade da SA de classe BCS II; no caso da SA de classe BCS III verificou-se que a utilização do surfactante (Kolliphor P407 Micro) resultou no aumento da solubilidade da molécula; já para a SA de classe BCS IV a combinação de co-solventes (etanol absoluto e PEG 400), bem como a combinação do co-solvente (etanol absoluto) com o surfactante PEG 6000 resultaram no aumento da solubilidade do composto.

Das substâncias ativas estudadas a substância ativa de classe BCS I apresentou a solubilidade alvo máxima em solução aquosa, sem ter sido necessário recorrer a estratégias para o aumento da solubilidade, tal como a solubilidade alvo mínima que foi atingida para a substância ativa de classe BCS III.

No caso das substâncias ativas de classe BCS II e IV os valores de solubilidade obtidos não foram suficientes para atingir a solubilidade alvo. No entanto, como trabalho futuro, poderão ser testadas estratégias alternativas para aumentar a solubilidade das moléculas em estudo. Nomeadamente, no caso da SA de classe BCS II, pelo uso de surfactantes com co-solventes, e para as SA de classe BCS III e IV com o uso de ciclodextrinas em co-solventes. Adicionalmente poderão ser também testadas alterações de pH e/ou temperatura das soluções para perceber qual o seu efeito na solubilidade das substâncias ativas.

Este trabalho permitiu assim, ampliar o conhecimento de diferentes estratégias para aumentar a solubilidade de moléculas pouco solúveis em solução aquosa, e cujo conhecimento poderá ser aplicado a futuros projetos em desenvolvimento na empresa.

Para além do projeto desenvolvido no âmbito da dissertação de mestrado, estive também em contacto com outros departamentos da empresa, nomeadamente o departamento de Desenvolvimento Analítico e Galénico onde realizei atividades relacionadas com a análise de amostras por HPLC e ensaios de dissolução para diferentes projetos em desenvolvimento na empresa.

## Bibliografia

- [1] INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, Portugal [Em linha] [Consultado 20 abril 2018] Disponível em [http://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos\\_uso\\_humano](http://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos_uso_humano)
- [2] ZANOWIAK, Paul; ALLEN, Loyd Vernon Jr. Pharmaceutical dosage forms. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2014, 1-45.
- [3] COMPILADA, Legislação Farmacêutica. Decreto-Lei n. ° 176/2006, de 30 de Agosto. Diário da República, 1ª série, 2006, 167.
- [4] RASOOL HASSAN, B. A. Overview on Pharmaceutical Formulation and Drug Design. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 2012, 3.10.
- [5] PARTICLE SCIENCES - Technical Brief 2011 Volume 9 - Biopharmaceutical Classification System and Formulation Development. [Em linha] [Consultado 24 abril 2018] Disponível em [http://www.particlesciences.com/docs/technical\\_briefs/TB\\_2011\\_9.pdf](http://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_2011_9.pdf)
- [6] VAN DER VOSSEN, Anna C., VAN DER VELDE, I.; SMEETS, O. S. N. M.; POSTMA, D.J.; ECKHARDT, M.; VERMES, A.; KOCH, B.C.P.; VULTO, A.G.; Hanff, L.M. Formulating a poorly water soluble drug into an oral solution suitable for paediatric patients; lorazepam as a model drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 100: 205-210.
- [7] DAHAN, Arik; MILLER, Jonathan M. The solubility–permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 2012, 14.2: 244-251.
- [8] GÖKE, Katrin; LORENZ, Thomas; REPANAS, Alexandros; SCHNEIDER, Frederic; STEINER, Denise; BAUMANN, Knut; BUNJES, Heike; DIETZEL, Andreas; FINKE, Jan H.; Glasmacher, BIRGIT; KWAD, Arno. Novel strategies for the formulation and processing of poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017, 126: 40-56.

[9] ALSHORA, Doaa Hasan; IBRAHIM, Mohamed Abbas; ALANAZI, Fars Kaed. Nanotechnology from particle size reduction to enhancing aqueous solubility. *Surface Chemistry of Nanobiomaterials*. 2016, 163-191.

[10] SANGHVI, Ritesh; NARAZAKI, Ryuichi; MACHATHA, Stephen G.; YALKOWSKY, Samuel H. Solubility improvement of drugs using N-methyl pyrrolidone. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 2008, 9.2: 366-376.

[11] KHADKA, Prakash; RO, Jieun; KIM, Hyeongmin; KIM, Iksoo; KIM, Jeong T.; KIM, Hyunil; CHO, Jae M.; YUN, Gyiae; LEE, Jaehwi. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 9.6: 304-316.

[12] PERSSON, Linda C.; PORTER, Christopher J. H.; CHARMAN, William N.; BERGSTRÖM, Christel A. S. Computational prediction of drug solubility in lipid based formulation excipients. *Pharmaceutical research*, 2013, 30.12: 3225-3237.

[13] SHAH, Amit K.; AGNIHOTRI, Sunil A. Recent advances and novel strategies in pre-clinical formulation development: an overview. *Journal of controlled release*, 2011, 156.3: 281-296.

[14] SAVJANI, Ketan T.; GAJJAR, Anuradha K.; SAVJANI, Jignasa K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *International Scholarly Research Network Pharmaceuticals*, 2012, 1-10.

[15] USP - General Notices and Requirements - USP-NF. [Em linha] [Consultado 17 abril 2018] Disponível em [http://www.uspnf.com/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/generalNoticesandRequirementsFinal.pdf](http://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/generalNoticesandRequirementsFinal.pdf)

[16] CHAURASIA, Gita. A review on pharmaceutical preformulation studies in formulation and development of new drug molecules. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2016, 7.6: 2313.

[17] SRIVALLI, Kale Mohana Raghava; MISHRA, Brahmeshwar. Improved aqueous solubility and antihypercholesterolemic activity of ezetimibe on formulating with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and hydrophilic auxiliary substances. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 2016, 17.2: 272-283.

[18] WILLIAMS, Hywel D.; TREVASKIS, Natalie L.; CHARMAN, Susan A.; SHANKER, Ravi M.; CHARMAN, William N.; POUTON, Colin W.; PORTER, Christopher J. H.; CHRISTOPOULOS, Arthur. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacological reviews*, 2013, 65.1: 315-499.

[19] KALEPU, Sandeep; NEKKANTI, Vijaykumar. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2015, 5.5: 442-453.

[20] KRONBERG, Bengt; HOLMBERG, Krister; LINDMAN, Björn. Types of Surfactants, their Synthesis, and Applications. *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers*, John Wiley and Sons, 2014, 1, 1-47.

[21] PARTICLE SCIENCES - Technical Brief 2010 Volume I - Surfactants. [Em linha] [Consultado 28 abril 2018] Disponível em <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2010/surfactants.html>

[22] KRONBERG, Bengt; HOLMBERG, Krister; LINDMAN, Björn. Surfactant Self-Assembly: General Aspects and Spherical Micelles. *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers*, John Wiley and Sons, 2014, 4, 75-94.

[23] CHANDLER, David. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*, 2005, 437.7059: 640.

[24] DATAPHYSICS - Understanding interfaces Surfactants and critical micelle concentration (CMC). [Em linha] [Consultado 15 maio 2018] Disponível em <http://www.dataphysics.de/2/start/understanding-interfaces/basics/surfactants-and-critical-micelle-concentration-cmc/>

[25] DALTIN, Decio. Introdução e primeiros conceitos, Tensoativos: química, propriedades e aplicações. *Blucher, São Paulo*, 2011, 1:1-43.

- [26] MURA, Paola. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 101: 238-250.
- [27] MIRANDA, Janisse C.; MARTINS, Tércio E. A.; VEIGA, Francisco; FERRAZ, Humberto G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 47.4: 665-681.
- [28] JAMBHEKAR, Sunil S.; BREEN, Philip. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discovery Today*, 2016, 21.2: 356-362.
- [29] JANSOOK, Phatsawee; OGAWA, Noriko; LOFTSSON, Thorsteinn. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 535.1-2: 272-284.
- [30] PALEM, Chinna R.; CHOPPARAPU, Karthik S. C.; P.V.R.S., Subrahmanyam; YAMSANI, Madhusudan R. Cyclodextrins and their Derivatives in Drug Delivery: A Review. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*, 2012, 6.3.
- [31] SHARMA, Neha; BALDI, Ashish. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug Delivery*, 2016, 23.3: 729-747.
- [32] FDA - Inactive Ingredient Database [Em linha] [Consultado 2 janeiro 2018] Disponível em <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>
- [33] BREWSTER, Marcus E.; LOFTSSON, Thorsteinn. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007, 59.7: 645-666.
- [34] DEL VALLE, EM Martin. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, 2004, 39.9: 1033-1046.
- [35] LOFTSSON, Thorsteinn; BREWSTER, Marcus E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010, 62.11: 1607-1621.

- [36] LOFTSSON, Thorsteinn; BREWSTER, Marcus E. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 101.9: 3019-3032.
- [37] NANDI, Indranil, BATESON, Michelle; BARI, Mohammad; JOSHI, Hemant N. Synergistic effect of PEG-400 and cyclodextrin to enhance solubility of progesterone. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 2003, 4.1: 1.
- [38] MUANKAEW, Chutimon; LOFTSSON, Thorsteinn. Cyclodextrin-Based Formulations: A Non-Invasive Platform for Targeted Drug Delivery. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2018, 122.1: 46-55.
- [39] TIAN, Yao-Qi; ZHOU, Xing; JIN, Zheng-Yu. Use of cyclodextrins in food, pharmaceutical and cosmetic industries. *Cyclodextrin Chemistry: Preparation and Application*. 2013. 215-233.
- [40] SZEJTLI, J.; SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2005, 61.3: 115-125.
- [41] SPharm [Em linha] [Consultado 7 junho 2018] Disponível em <https://spharm-inc.com/the-drug-approval-process-in-canada-an-eguide/>
- [42] BEHERA, Siladitya; GHANTY, Subhajit; AHMAD, Fahad; SANTRA, Saayak; BANERJEE, Sritoma. UV-visible spectrophotometric method development and validation of assay of paracetamol tablet formulation. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2012, 3.6: 151-7.
- [43] AGILENT TECHNOLOGIES - Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System operator's manual. [Em linha] [Consultado 15 janeiro 2018] Disponível em [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1115-90042\\_OperatorManual.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1115-90042_OperatorManual.pdf)
- [44] ICH, I. C. H. Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology. *International Conference on Harmonization, Geneva*. 2005.
- [45] THOMPSON, Judith E.; DAVIDOW, Lawrence W. Agentes indutores de viscosidade, A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos. *Artmed Editora*, 2016, 19, 247-266.

## Anexos

**Tabela I.** Dados da especificidade da SA de classe BCS I.

$\lambda$ (nm)	Excipientes	SA Classe BCS I		Fórmula Reconstituída		Interf. 1 (%)	Interf. 2 (%)
	Média (Abs) (n=3)	Média (Rf) (n=3)	Média (Abs) (n=3)	Média (Rf) (n=3)	Média (Abs) (n=3)		
226	0,0075	28,04	1,1566	28,46	1,1737	0,69	1,48
227	0,0071	29,46	1,2148	29,86	1,2316	0,62	1,38
228	0,0073	30,71	1,2665	31,08	1,2820	0,58	1,22
234	0,0054	31,27	1,2898	31,58	1,3024	0,42	0,98
235	0,0051	29,78	1,2280	30,07	1,2401	0,42	0,99
236	0,0048	27,56	1,1368	27,88	1,1499	0,42	1,15
237	0,0046	24,85	1,0249	25,14	1,0368	0,45	1,16

**Tabela II.** Dados da especificidade da SA de classe BCS II.

$\lambda$ (nm)	Excipientes	SA Classe BCS II		Fórmula Reconstituída		Interf. 1 (%)	Interf. 2 (%)
	Média (Abs) (n=3)	Média (Rf) (n=3)	Média (Abs) (n=3)	Média (Rf) (n=3)	Média (Abs) (n=3)		
226	0,0110	52,38	1,0568	52,71	1,0634	1,04	0,62
227	0,0106	46,56	0,9393	46,86	0,9454	1,13	0,65
244	0,0069	49,29	0,9945	49,47	0,9981	0,69	0,36
245	0,0069	52,10	1,0513	52,26	1,0544	0,66	0,30
246	0,0067	54,93	1,1082	55,04	1,1105	0,60	0,20
262	0,0056	54,34	1,0964	54,49	1,0995	0,51	0,28
263	0,0059	50,19	1,0127	50,34	1,0157	0,58	0,30



**Tabela III.** Dados da especificidade da SA de classe BCS III.

$\lambda$ (nm)	Excipientes	SA Classe BCS III		Fórmula Reconstituída		Interf. 1 (%)	Interf. 2 (%)
	Média (Abs) (n=3)	Média (Rf) (n=3)	Média (Abs) (n=3)	Média (Rf) (n=3)	Média (Abs) (n=3)		
237	0,0055	26,28	1,0437	26,54	1,0543	0,53	1,02
238	0,0055	25,27	1,0038	25,55	1,0149	0,54	1,11
239	0,0055	24,34	0,9996	24,60	0,9772	0,57	1,09
264	0,0014	24,62	0,9778	24,67	0,9798	0,15	0,20
265	0,0016	25,14	0,9986	25,20	1,0010	0,16	0,25
266	0,0015	25,48	1,0119	25,56	1,0151	0,15	0,32
267	0,0013	25,65	1,0190	25,73	1,0220	0,13	0,30

**Tabela IV.** Dados da especificidade da SA de classe BCS IV.

$\lambda$ (nm)	Excipientes	SA Classe BCS III		Fórmula Reconstituída		Interf. 1 (%)	Interf. 2 (%)
	Média (Abs) (n=3)	Média (Rf) (n=3)	Média (Abs) (n=3)	Média (Rf) (n=3)	Média (Abs) (n=3)		
237	0,0028	40,21	1,1941	40,33	1,1978	0,23	0,31
238	0,0027	37,03	1,0998	37,17	1,1040	0,24	0,38
239	0,0026	33,94	1,0080	34,09	1,0124	0,26	0,43
240	0,0024	30,94	0,9167	31,03	0,9215	0,27	0,52

**Tabela V.** Dados da calibração e concentração obtida para as amostras da SA de classe BCS I relativos ao parâmetro de exatidão.

	<b>Solução Padrão 1</b>	<b>Solução Padrão 2</b>
<b>Concentração (mg/mL)</b>	0,0402	0,0402
<b>Média (Abs)</b> (n=3)	1,2047	1,2017
<b>Média (Rf)</b> (n=3)	29,95	29,92
<b>MRf</b>	29,94	
<b>Amostras Fórmula Reconstituída</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Concentração Obtida (mg/mL)</b>
<b>1</b>	1,1990	0,0400
<b>2</b>	1,1960	0,0399
<b>3</b>	1,1791	0,0394

**Tabela VI.** Dados da calibração e concentração obtida para as amostras da SA de classe BCS II relativos ao parâmetro de exatidão.

	<b>Solução Padrão 1</b>	<b>Solução Padrão 2</b>
<b>Concentração (mg/mL)</b>	0,0200	0,0200
<b>Média (Abs)</b> (n=3)	1,0355	1,0436
<b>Média (Rf)</b> (n=3)	51,86	52,14
<b>MRf</b>	52,00	
<b>Amostras Fórmula Reconstituída</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Concentração Obtida (mg/mL)</b>
<b>1</b>	1,0428	0,0201
<b>2</b>	1,0425	0,0200
<b>3</b>	1,0520	0,0202

**Tabela VII.** Dados da calibração e concentração obtida para as amostras da SA de classe BCS III relativos ao parâmetro de exatidão.

	<b>Solução Padrão 1</b>	<b>Solução Padrão 2</b>
<b>Concentração (mg/mL)</b>	0,0396	0,0399
<b>Média (Abs)</b> (n=3)	0,9822	0,9845
<b>Média (Rf)</b> (n=3)	24,78	24,69
<b>MRf</b>	24,73	
<b>Amostras Fórmula Reconstituída</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Concentração Obtida (mg/mL)</b>
<b>1</b>	0,9858	0,0399
<b>2</b>	0,9914	0,0401
<b>3</b>	0,9754	0,0394

**Tabela VIII.** Dados da calibração e concentração obtida para as amostras da SA de classe BCS IV relativos ao parâmetro de exatidão.

	<b>Solução Padrão 1</b>	<b>Solução Padrão 2</b>
<b>Concentração (mg/mL)</b>	0,0300	0,0301
<b>Média (Abs)</b> (n=3)	1,0147	1,0173
<b>Média (Rf)</b> (n=3)	33,78	33,80
<b>MRf</b>	33,79	
<b>Amostras Fórmula Reconstituída</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Concentração Obtida (mg/mL)</b>
<b>1</b>	1,0194	0,0302
<b>2</b>	1,0134	0,0300
<b>3</b>	1,0021	0,0297

**Tabela IX.** Dados da calibração e solubilidade obtida para a SA de classe BCS I em solução aquosa.

	Solução Padrão 1		Solução Padrão 2	
Concentração (mg/mL)	0,0404		0,0402	
Média (Abs) (n=3)	1,1581		1,1569	
Média (Rf) (n=3)	28,70		28,75	
MRf	28,73			
Solução	Absorvância	Fator de Diluição	Solubilidade Obtida (mg/mL)	
H <sub>2</sub> O	1,1418	787,5	31,30	

**Tabela X.** Dados da calibração e solubilidade obtida para a SA de classe BCS II em solução aquosa.

	Solução Padrão 1		Solução Padrão 2	
Concentração (mg/mL)	0,0216		0,0221	
Média (Abs) (n=3)	1,0587		1,1061	
Média (Rf) (n=3)	49,11		49,97	
MRf	49,54			
Solução	Absorvância	Fator de Diluição	Solubilidade Obtida (mg/mL)	
H <sub>2</sub> O	0,2212	1	0,0045	

**Tabela XI.** Dados da calibração e solubilidade obtida para a SA de classe BCS II em solução hidroalcoólica.

	Solução Padrão 1		Solução Padrão 2	
Concentração (mg/mL)	0,0200		0,0205	
Média (Abs) (n=3)	1,0284		1,0347	
Média (Rf) (n=3)	51,30		50,51	
MRf	50,91			
Solução	Absorvância	Fator de Diluição	Solubilidade Obtida (mg/mL)	
H <sub>2</sub> O:EtOH (1,7:1)	0,7923	10,0	0,1556	

**Tabela XII.** Dados da calibração e solubilidades obtidas para a SA de classe BCS II em solução aquosa com ciclodextrinas.

	Solução Padrão 1	Solução Padrão 2	
Concentração (mg/mL)	0,0216	0,0221	
Média (Abs) (n=3)	1,0587	1,1061	
Média (Rf) (n=3)	49,11	49,97	
MRf	49,54		
Solução	Absorvância	Fator de Diluição	Solubilidade Obtida (mg/mL)
H <sub>2</sub> O:HP-β-CD_1,4%	0,6499	5,21	0,0683
H <sub>2</sub> O:HP-β-CD_7,0%	0,7008	21,65	0,3062
H <sub>2</sub> O:HP-β-CD_14%	0,6347	50,50	0,6470
H <sub>2</sub> O:HP-β-CD_35%	0,7286	109,9	1,6163
H <sub>2</sub> O:HP-β-CD_71%	0,6185	219,1	2,7355

**Tabela XIII.** Dados da calibração e solubilidade obtida para a SA de classe BCS III em solução aquosa.

	<b>Solução Padrão 1</b>		<b>Solução Padrão 2</b>
<b>Concentração (mg/mL)</b>	0,0406		0,0408
<b>Média (Abs)</b> (n=3)	0,9932		0,9955
<b>Média (Rf)</b> (n=3)	24,44		24,42
<b>MRf</b>	24,43		
<b>Solução</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Fator de Diluição</b>	<b>Solubilidade Obtida (mg/mL)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0,9554	679,3	26,57

**Tabela XIV.** Dados da calibração e solubilidades obtidas para a SA de classe BCS III em solução aquosa com surfactantes e solução aquosa com o co-solvente PEG 400.

	<b>Solução Padrão 1</b>		<b>Solução Padrão 2</b>
<b>Concentração (mg/mL)</b>	0,0406		0,0408
<b>Média (Abs)</b> (n=3)	0,9932		0,9955
<b>Média (Rf)</b> (n=3)	24,44		24,42
<b>MRf</b>	24,43		
<b>Solução</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Fator de Diluição</b>	<b>Solubilidade Obtida (mg/mL)</b>
<b>H<sub>2</sub>O:SLS</b>	0,9082	7,41	0,28
<b>H<sub>2</sub>O:Tween 80</b>	0,9512	677,5	26,38
<b>H<sub>2</sub>O:Kolliphor</b>	0,9656	730,9	28,89
<b>H<sub>2</sub>O:PEG 6000</b>	0,8931	696,4	25,46
<b>H<sub>2</sub>O:PEG 400</b>	0,8733	689,7	24,65

**Tabela XV.** Dados da calibração e solubilidades obtidas para a SA de classe BCS III em solução hidroalcoólica, solução hidroalcoólica com surfactantes e com o co-solvente (PEG 400).

	<b>Solução Padrão 1</b>	<b>Solução Padrão 2</b>	
<b>Concentração (mg/mL)</b>	0,0406	0,0405	
<b>Média (Abs) (n=3)</b>	0.9945	0,9829	
<b>Média (Rf) (n=3)</b>	24,49	24,28	
<b>MRf</b>	24,39		
<b>Solução</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Fator de Diluição</b>	<b>Solubilidade Obtida (mg/mL)</b>
<b>H<sub>2</sub>O:EtOH (1,7:1)</b>	0,9403	260,4	10,04
<b>H<sub>2</sub>O:EtOH:SLS</b>	0,9042	4,07	0,15
<b>H<sub>2</sub>O: EtOH:Tween 80</b>	0,9427	267,5	10,34
<b>H<sub>2</sub>O: EtOH:Kolliphor</b>	0,9501	249,5	9,72
<b>H<sub>2</sub>O: EtOH:PEG 6000</b>	0,9890	258,9	10,50
<b>H<sub>2</sub>O: EtOH:PEG 400</b>	0,9883	277,7	11,25

**Tabela XVI.** Dados da calibração e solubilidade obtida para a SA de classe BCS IV em solução aquosa.

	<b>Solução Padrão 1</b>	<b>Solução Padrão 2</b>	
<b>Concentração (mg/mL)</b>	0,0298	0,0298	
<b>Média (Abs) (n=3)</b>	1,0123	1,0162	
<b>Média (Rf) (n=3)</b>	33,97	34,06	
<b>MRf</b>	34,01		
<b>Solução</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Fator de Diluição</b>	<b>Solubilidade Obtida (mg/mL)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0,9330	5,0	0,1372

**Tabela XVII.** Dados da calibração e solubilidades obtidas para a SA de classe BCS IV em solução aquosa com surfactantes.

	Solução Padrão 1		Solução Padrão 2	
Concentração (mg/mL)	0,0297		0,0298	
Média (Abs) (n=3)	1,0083		1,0167	
Média (Rf) (n=3)	33,90		34,07	
MRf	33,99			
Solução	Absorvância	Fator de Diluição	Solubilidade Obtida (mg/mL)	
H <sub>2</sub> O:SLS	0,9736	6,10	0,1747	
H <sub>2</sub> O:Tween 80	0,9862	15,15	0,4396	
H <sub>2</sub> O:Kolliphor	0,9849	5,56	0,1611	
H <sub>2</sub> O:PEG 6000	0,9815	10,19	0,2942	

**Tabela XVIII.** Dados da calibração e solubilidades obtidas para a SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica e solução aquosa com o co-solvente PEG 400.

	Solução Padrão 1		Solução Padrão 2	
Concentração (mg/mL)	0,0298		0,0298	
Média (Abs) (n=3)	1,0103		1,0097	
Média (Rf) (n=3)	33,90		33,84	
MRf	33,87			
Solução	Absorvância	Fator de Diluição	Solubilidade Obtida (mg/mL)	
H <sub>2</sub> O:EtOH (1,7:1)	1,0527	100,0	3,1080	
H <sub>2</sub> O:PEG 400	0,6851	14,71	0,2975	



**Tabela XIX.** Dados da calibração e solubilidades obtidas para a SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica com surfactantes.

	Solução Padrão 1		Solução Padrão 2	
Concentração (mg/mL)	0,0297		0,0298	
Média (Abs) (n=3)	1,0083		1,0167	
Média (Rf) (n=3)	33,90		34,07	
MRf	33,99			
Solução	Absorvância	Fator de Diluição	Solubilidade Obtida (mg/mL)	
H <sub>2</sub> O:EtOH:SLS	0,9251	105,82	2,8801	
H <sub>2</sub> O: EtOH:Tween 80	0,9806	105,82	3,0529	
H <sub>2</sub> O: EtOH:Kolliphor	0,9921	103,63	3,0248	
H <sub>2</sub> O: EtOH:PEG 6000	0,9474	166,67	4,6456	

**Tabela XX.** Dados da calibração e solubilidade obtida para a SA de classe BCS IV em solução hidroalcoólica com o co-solvente PEG 400.

	Solução Padrão 1		Solução Padrão 2	
Concentração (mg/mL)	0,0298		0,0298	
Média (Abs) (n=3)	1,0103		1,0097	
Média (Rf) (n=3)	33,90		33,84	
MRf	33,87			
Solução	Absorvância	Fator de Diluição	Solubilidade Obtida (mg/mL)	
H <sub>2</sub> O:EtOH:PEG 400	0,9757	162,33	4,6764	